



Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

UAM

Una aproximación a la fisiología del acoplamiento excitación-secreción en la sinapsis esplácnico-cromafín

TESIS DOCTORAL

ANTONIO MIGUEL GARCÍA DE DIEGO

Director:

Antonio García García

Madrid, diciembre 2009



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

ANTONIO GARCÍA GARCÍA, Catedrático del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA que Don ANTONIO MIGUEL GARCÍA DE DIEGO ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: “Una aproximación a la fisiología del acoplamiento excitación-secreción en la sinapsis esplácnico-cromafín”, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 17 de noviembre de 2009.

Dr. Antonio García García
Catedrático de Farmacología

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología BFI2003-02722, la Dirección General de Investigación Científica y Técnica SAF2006-03589, el Ministerio de Ciencia e Innovación RETIC-RD06/0026 ISC Carlos III y la Comunidad Autónoma de Madrid SAL2006/0275, proyectos concedidos a Antonio G. García. Antonio Miguel García de Diego ha sido becario FPI (BFI2003-02722) y de la Fundación Teófilo Hernando.

RELACIÓN DE COLABORADORES

Antonio G. García
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

Luís Gandía
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

Jesús M. Hernández-Guijo
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

Manuela G. López
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

Mercedes Villarroya
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

María F. Cano-Abad
Departamento de Farmacología y
Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
C/Arzobispo Morcillo, 4
28029 Madrid

Luis M. Gutiérrez
Instituto de Neurociencias
CSIC-Universidad Miguel Hernández,
Campus de San Juan
03550 Alicante

Jakob Sørensen
Dept. of Molecular Mechanisms of
Exocytosis
Max Planck Institute for Biophysical
Chemistry
Am Fassberg, 11
37077 Göttingen Alemania

Erwin Neher
Dept. of Membrane Biophysics
Max Planck Institute for Biophysical
Chemistry
Am Fassberg, 11
37077 Göttingen Alemania

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	6
MARCO DE ESTA TESIS	7
INTRODUCCIÓN	10
1.- La médula de la glándula adrenal forma parte del sistema nervioso autónomo simpático.....	11
2.- El tono simpático.....	13
3.- La célula cromafín y el concepto de paraneurona	13
4.- Síntesis y degradación de las catecolaminas. Células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas.....	14
5.- Excitabilidad de la célula cromafín	16
6.- El proceso de exocitosis en la célula cromafín.....	21
7.- Modulación de las corrientes de Ca^{2+} , la respuesta secretora y la excitabilidad	23
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.- Cultivo de células cromafines bovinas.....	32
2.- Histoquímica, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	34
2.1. Preparación de secciones de glándula adrenal bovina.....	34
2.2. Tinción con hematoxilina-eosina en glándula adrenal bovina.....	34
2.3. Inmunohistoquímica de TH y PNMT en glándula adrenal bovina	35
2.4. Tinción de acetilcolinesterasa en glándula adrenal bovina.....	35
2.5. Inmunofluorescencia de TH y Hoechst en glándula adrenal bovina.....	35
2.6. Inmunofluorescencia de DBH y PNMT en células cromafines en cultivo... 36	
3.- Técnica de amperometría	36
3.1. Descripción de la técnica	36
3.2 Construcción de los electrodos de amperometría.....	37
3.3. Calibrado de los electrodos de amperometría	38
4.- Técnica de patch-clamp	38
4.1. Descripción de la técnica: fijación de voltaje y fijación de corriente.....	38
4.2. Variaciones de la capacidad de membrana	40
4.3. Datos técnicos sobre la elaboración de pipetas, capacidad y parche perforado	40
5.- Medida de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ con la sonda fluorescente Fluo-4	41
6.- Sistema de perfusión	42
7.- Soluciones y productos químicos	42
8.- Análisis estadístico	43
RESULTADOS	44
1.- Histología de la glándula adrenal bovina.....	45
1.1. La glándula adrenal bovina: Estructura general observada con la tinción histológica de hematoxilina-eosina.....	45
1.2. Las células cromafines de la médula de la glándula adrenal bovina están especializadas en la liberación de adrenalina y noradrenalina	47

1.3. Las células cromafines están polarizadas	49
1.4. Las células cromafines están inervadas por fibras nerviosas colinérgicas ...	50
1.5. Inmunofluorescencia de células cromafines en cultivo	52
2.- Excitabilidad de la célula cromafín bovina	53
2.1. Potencial de reposo y actividad espontánea en la célula cromafín bovina ...	53
2.2. Efectos despolarizantes de altas concentraciones de K^+ extracelular; concordancia con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)	55
2.3. Cambios en el potencial de membrana producidos por la superfusión continua de agonistas colinérgicos.....	56
2.4. Potenciales de acción evocados de forma controlada por AC	57
2.5. Potenciales evocados de forma controlada por aplicación repetida de estímulos eléctricos similares a las corrientes de AC	60
2.6. ¿Qué frecuencias de disparo puede alcanzar la célula cromafín?	62
3.- Secreción evocada por potenciales de acción en la célula cromafín bovina ...	66
3.1. Elaboración de los protocolos de potenciales de acción.....	66
3.2. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis evocadas por trenes de potenciales de acción y pulsos despolarizantes cuadrados.....	67
3.3. Separar exocitosis de endocitosis: Registros simultáneos de amperometría y patch-clamp	71
3.4. Relación entre entrada de Ca^{2+} , variaciones de C_m y duración del estímulo	72
3.5. Cinética de los cambios de $[Ca^{2+}]_c$ evocados por PA y PD	75
4.- Modulación de la excitabilidad, las corrientes de Ca^{2+} y la secreción	77
4.1. Modulación de la excitabilidad de la célula cromafín por metionina- encefalina.....	77
4.2. Modulación de las corrientes de Ca^{2+} y de la secreción evocada por trenes de potenciales de acción.....	77
DISCUSIÓN.....	80
1.- Histología general de la glándula adrenal bovina	81
2.- La inervación colinérgica y la distribución de la ACE	83
3.- Excitabilidad de la célula cromafín bovina	84
3.1. El K^+ y el Na^+ controlan el potencial de membrana en reposo	84
3.2. Sobre la perfusión prolongada de agonistas colinérgicos.....	85
3.3. Potenciales de acción evocados por perfusión rápida e intermitente de AC	86
4.- Secreción evocada por potenciales de acción en la célula cromafín bovina ...	87
4.1. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis producidas por PD y trenes de PA.....	87
4.2. Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ inducidos por PD y trenes de PA.....	89
5.- Modulación de la excitabilidad, las corrientes de Ca^{2+} y la secreción	90
6.- Comparación del modelo experimental de célula cromafín en cultivo con otros modelos.....	91
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	96

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC: Acetilcolina	NA: Noradrenalina
ACE: Acetilcolinesterasa	PA: Potencial(es) de acción
AD: Adrenalina	PBS: Tampón fosfato salino
ANOVA: Análisis de la varianza	PD: Pulso(s) despolarizante(s)
ATP: Trifosfato de adenosina	cuadrado(s)
Bcl-2: Linfoma/leucemia de células B 2	Q_{Ca}: Carga transportada por la corriente
BSA: Albúmina sérica bovina	de calcio
[Ca²⁺]_c: Concentración de calcio	Rs: Resistencia en serie
citósolica	SNA: Sistema nervioso autónomo
CCDV: Canal(es) de calcio	SNARE: Receptores de SNAP (Soluble
dependiente(s) de voltaje	N-ethylmaleimide sensitive fusion
Cm: Capacidad de la membrana	protein Attachment Protein)
DAB: Diaminobenzidina	TBS: Tampón Tris salino
DBH: Dopamina-β-hidroxilasa	TEA: Tetraetilamonio
DMEM: Modificación de Dulbecco del	TH: Tirosina hidroxilasa
medio basal de Eagle	TTX: Tetrodotoxina
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	UAF: Unidades arbitrarias de
e.e.: Error estándar	fluorescencia
EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético	VIP: Péptido intestinal vasoactivo
Em: Potencial de membrana	
FNMT: Feniletanolamina-N-metil	
transferasa	
GHK: Ecuación de Goldman-Hodgkin-	
Katz	
GTP: Trifosfato de guanosina	
H&E: Hematoxilina-eosina	
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-	
etanosulfónico de piperazinio	
I_{Ca}: Corriente de calcio	
L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina	
MAO: Monoamino oxidasa	
m-e: Péptido metionina-encefalina	

MARCO DE ESTA TESIS

Un distraído peatón se dispone a cruzar una ancha calle de una ciudad cualquiera. En el instante en que baja decididamente de la acera por la que venía caminando recibe una despiadada ronda de bocinazos de los enfurecidos conductores. Se acaba de poner el semáforo verde para los vehículos y rojo para los peatones. Reacciona de inmediato, se para en seco y en pocos segundos mira los coches, el semáforo, se da cuenta de la situación, gira sobre sus pies y salta de nuevo a la acera pidiendo perdón con la mano.

Cuando el cerebro interpreta una situación como alarmante pone en marcha la rama simpática del sistema nervioso autónomo. Uno de sus componentes es la médula de la glándula adrenal, que se encarga de liberar al torrente sanguíneo grandes cantidades de adrenalina que se distribuyen rápidamente por todo el cuerpo. Su efecto es el de preparar al organismo para la acción: los bronquios y las pupilas se dilatan, hay una vasodilatación periférica para aportar más sangre oxigenada a los músculos, y también una vasoconstricción en las vísceras donde se puede pasar con un pequeño aporte de sangre mientras dure la alarma; la adrenalina tiene efectos inotrópicos positivos sobre el corazón y estimula la glucogenolisis en el hígado y los músculos, además incrementa las capacidades de atención. Sin embargo un exceso de adrenalina circulante puede tener la fatal consecuencia de producir arritmia cardíaca. Esta delicada regulación de las catecolaminas circulantes es responsabilidad del eje simpático adrenal.

En condiciones basales, los nervios simpáticos disparan potenciales de acción a muy baja frecuencia, que se incrementa entre 10 y 20 veces en la reacción de alarma (reacción de “lucha o huida”) produciendo una secreción masiva de catecolaminas en la glándula adrenal. A pesar de que hace ya casi 100 años que W. Cannon señaló la importancia de este mecanismo en las situaciones de estrés agudo, y de la ingente cantidad de trabajos que se han dedicado a estudiarlo, poco se sabe sobre la respuesta de las células cromafines de la médula adrenal, que expulsan adrenalina y noradrenalina por exocitosis, ante estímulos parecidos a los que pueden aplicar las terminaciones nerviosas espláncnicas. En la presente tesis, empleando como modelo la célula cromafín bovina, se ha intentado profundizar en la respuesta de estas células a estímulos probablemente más fisiológicos que los hasta ahora empleados. Se han estudiado, mediante técnicas electrofisiológicas e histoquímicas, los determinantes de la generación de potenciales de acción con el objetivo de averiguar qué clase de estímulos podría recibir la célula cromafín y qué tipo de cambios en su actividad eléctrica producen estos estímulos. Se han elaborado protocolos con trenes de potenciales de

acción y se han medido las corrientes, la secreción y los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ que producen, y se han comparado con pulsos despolarizantes constantes, un estímulo ampliamente utilizado para la investigación en la relación estímulo-secreción en estas células, pero que seguramente no ocurre en condiciones naturales. Finalmente se ha estudiado cómo ciertas moléculas, co-liberadas con la acetilcolina de las terminaciones esplácnicas, o junto a las catecolaminas de las propias células cromafines pueden modular las respuestas ante estos patrones de estimulación más fisiológicos.

INTRODUCCIÓN

1.- La médula de la glándula adrenal forma parte del sistema nervioso autónomo simpático

John Newport Langley (1903) acuñó la expresión “sistema nervioso autónomo” (SNA) para referirse a la parte del sistema nervioso periférico que se encarga de controlar las vísceras y el medio interno del individuo actuando sobre el músculo liso, el músculo cardíaco, los vasos y las glándulas. Es un sistema involuntario, que funciona de manera automática a través de los reflejos autónomos y de un control central, localizados en centros nerviosos de la médula espinal, el tronco del encéfalo y el hipotálamo. El SNA deriva completamente de la cresta neural embrionaria (LeDouarin y Kalcheim, 1999).

El SNA se organiza en dos divisiones de estructura anatómica y función diferenciadas: la parasimpática o cráneo-sacra encargada del mantener el metabolismo basal, y la simpática o toraco-lumbar que se activa para preparar al organismo para la acción. Los axones de cada una de las divisiones que surgen del sistema nervioso central no viajan sin interrupción hasta los órganos efectores, sino que hacen sinapsis en agrupaciones de somas neuronales denominadas ganglios autónomos. (Fig. 1). Las neuronas de estos ganglios son las que transmiten la señal al órgano efector. Por lo tanto la conducción de la información se lleva a cabo primero mediante una neurona preganglionar cuyo cuerpo se encuentra en la sustancia gris del cerebro o de la médula y cuyo axón viaja hasta un ganglio autónomo. El neurotransmisor de las sinapsis de las neuronas preganglionares con los ganglios autónomos es la acetilcolina, que actúa sobre receptores nicotínicos y muscarínicos postsinápticos ganglionares. Los axones de la segunda neurona o neurona postganglionar viajan desde un ganglio autónomo hasta el órgano efector. El neurotransmisor de la neurona postganglionar parasimpática es la acetilcolina que actúa sobre receptores muscarínicos. El neurotransmisor en la rama simpática de esta segunda sinapsis es la noradrenalina (y la adrenalina si se libera por las células cromafines de la médula adrenal) que actúa sobre receptores α y β -adrenérgicos cuyos efectos son excitadores o inhibidores dependiendo del tejido diana.

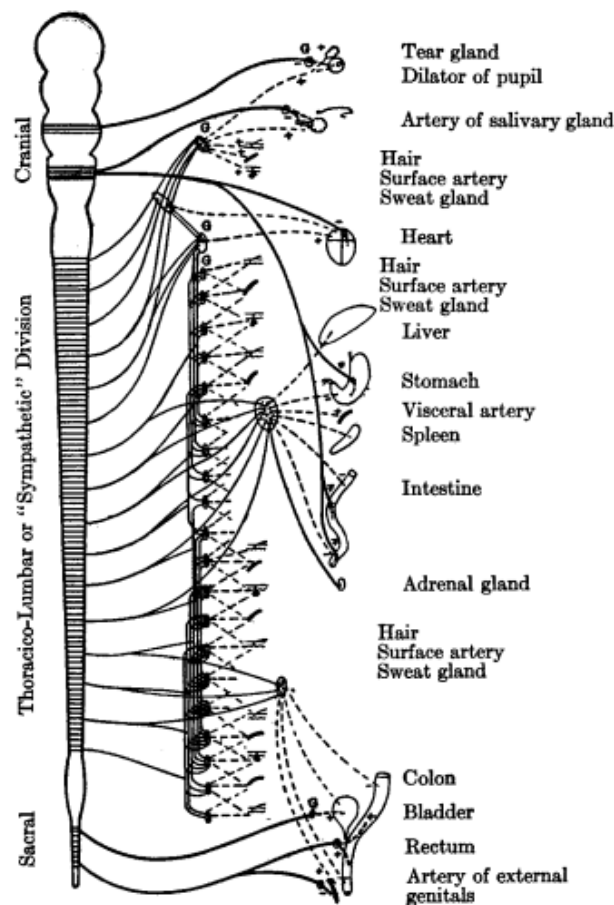


Figura 1. Organización del sistema nervioso autónomo. Los axones preganglionares abandonan el sistema nervioso central y se dirigen hacia los ganglios. Una diferencia anatómica notable entre las divisiones simpática y parasimpática es que los ganglios simpáticos se encuentran a ambos lados de la columna vertebral (paravertebrales), a una cierta distancia de los órganos efectores; los ganglios parasimpáticos sin embargo, se encuentran muy cerca o sobre el mismo órgano efector. Por esta razón las fibras preganglionares (líneas continuas) cráneo-sacras son largas y acaban aparentemente sobre los órganos diana por lo que sus fibras postganglionares (líneas discontinuas) no se aprecian; casi todas las fibras postganglionares que se aprecian en el esquema son simpáticas. Tomado de W. B. Cannon (1915).

La médula adrenal forma parte del sistema nervioso simpático. Está inervada por fibras nerviosas colinérgicas preganglionares procedentes de los nervios esplácnicos. Sin embargo las células cromafines que forman su parénquima no emiten axones hacia ningún órgano efector; son células poligonales agrupadas en acinos rodeadas de capilares (véase apartado 1 de Resultados). Cuando son estimuladas liberan por exocitosis catecolaminas directamente al torrente sanguíneo. Su efecto, por lo tanto, no está localizado en una sola sinapsis sino que en pocos segundos alcanza prácticamente todas las células del cuerpo. Son similares en esta característica a otras hormonas como

las tiroideas o los glucocorticoides; pero a diferencia de éstas, su liberación se encuentra bajo el control directo del sistema nervioso central; además, funcionalmente los efectos de las catecolaminas se inducen y disipan rápidamente a diferencia de los efectos más lentos y de duración más prolongada de otras hormonas. Se podría decir que son neuronas postganglionares modificadas cuyas secreciones tienen un efecto sistémico.

En resumen, el SNA se encarga de lo que W. Cannon denominó homeostasia, o mantenimiento del medio interno en un estado óptimo. La médula adrenal forma parte de la división simpática del SNA y las células cromafines que la constituyen pueden considerarse células simpáticas postganglionares modificadas especializadas en la secreción principalmente de catecolaminas al torrente sanguíneo.

2.- El tono simpático

Con bajas frecuencias de estimulación, el sistema nervioso autónomo consigue la activación de los órganos efectores. El tono basal se mantiene con el disparo de un potencial de acción cada pocos segundos y la activación máxima se consigue con frecuencias de disparo de 10 ó 20 Hz (Guyton y Hall, 2006a). Esto contrasta drásticamente con la activación máxima de otras neuronas, como las motoras que actúan sobre el músculo esquelético superando frecuencias de disparo de 500 Hz (Guyton y Hall, 2006b).

Los órganos inervados por el simpático tienen una estimulación doble: por un lado los nervios simpáticos los inervan directamente y por otro hay una estimulación indirecta por medio de las hormonas adrenomedulares. La secreción basal de adrenalina y noradrenalina en la médula adrenal humana, es suficiente para mantener la presión sanguínea a niveles prácticamente normales incluso sin tener en cuenta la inervación simpática cardiovascular directa. Por lo tanto, este mecanismo de inervación doble sirve como seguridad adicional en caso de que uno de los dos mecanismos fracase. Además, las secreciones de la médula adrenal alcanzan estructuras que no están directamente inervadas por el sistema simpático.

3.- La célula cromafín y el concepto de paraneurona

Se ha propuesto el concepto de paraneurona para designar un conjunto de células endocrinas que comparten características estructurales, funcionales y metabólicas con las neuronas, a saber: i) producen sustancias similares a las neuronas como péptidos, aminas y otros neurotransmisores; ii) estas sustancias se almacenan en vesículas; iii)

tienen un polo celular receptor de estímulos y otro secretor por donde liberan las mencionadas sustancias por un proceso de exocitosis; iv) son de origen embrionario neuroectodérmico (Fujita, 1989).

En general, la organización funcional de las neuronas es mucho más aparente en su estructura. De forma simplificada, hay una zona receptora que suele localizarse en el árbol dendrítico y en el soma, y una zona secretora con o sin ramificaciones. La porción conductora de la electricidad puede por tanto abarcar gran distancia, y la señal eléctrica ha de regenerarse por medio de potenciales de acción para poder alcanzar la región terminal. El tamaño de las paraneuronas sin embargo, es lo suficientemente pequeño como para que la señal eléctrica se transmita a la región secretora sin necesidad de regeneración (Kanno, 1989).

La célula cromafín es una paraneurona (y por ello de ascendencia neuroectodérmica), que fabrica catecolaminas que almacena en vesículas secretoras de núcleo denso y que luego libera por exocitosis producida por la entrada de iones Ca^{2+} a través de canales voltaje-dependientes, abiertos por el disparo de potenciales de acción. Tiene un diámetro de unos 10 a 20 μm y una forma esférica en cultivo y poligonal *in situ*. Está inervada por unas pocas fibras colinérgicas y las vesículas secretoras se localizan en la zona opuesta al núcleo proporcionándole una característica polarización. Las células cromafines emiten neuritas en cultivo, lo que es una prueba más de su parentesco con las neuronas (véase figura 12 en el apartado 1 de Resultados). Debido a las características que comparte con las neuronas, además de a su facilidad de obtención y cultivo, se ha empleado con frecuencia para el estudio de los procesos neurosecretores.

4.- Síntesis y degradación de las catecolaminas. Células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas

Las catecolaminas son hormonas simpaticomiméticas (remedan los efectos del sistema nervioso simpático) que se liberan en respuesta al estrés psicológico, físico o ambiental. Se llaman catecolaminas porque contienen un grupo catecol y son derivadas del aminoácido tirosina. Las catecolaminas más abundantes son la adrenalina (neurohormona secretada por la médula adrenal y neurotransmisor en ciertas áreas del cerebro como el bulbo raquídeo y la protuberancia), la noradrenalina (neurotransmisor en el locus coeruleus del encéfalo y en el sistema nervioso simpático) y la dopamina

(neurotransmisor en el sistema nervioso central, abundante en la *substantia nigra* y en el área tegmental ventral del cerebro).

Blaschko propuso que las catecolaminas se fabrican a partir del aminoácido tirosina (Blaschko, 1957). La tirosina se ingiere con las proteínas de la dieta o se genera a partir de la fenilalanina mediante la enzima fenilalanina hidroxilasa. La tirosina, ya en las células catecolaminérgicas, se convierte en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) gracias a la enzima citosólica tirosina hidroxilasa (TH) (Fig. 2), utilizando tetrahidrobiopterina, oxígeno y Fe^{2+} como cofactor. Esta reacción, que depende de los niveles de oxígeno y se autorregula negativamente por L-DOPA y por dopamina, constituye el paso limitante en la síntesis de catecolaminas, ya que la actividad enzimática de la TH es de 100 a 1000 veces menor que la de las otras enzimas que intervienen en la ruta. Además la tirosina hidroxilasa es un tetrámero que se regula por fosforilación de residuos de serina por la calcio-calmodulín-cinasa II y por la proteína cinasa A, aumentando la actividad de la enzima. De esta forma, los estímulos despolarizantes originan una entrada de calcio que produce la activación de la tirosina hidroxilasa. Además de la actividad, el número de moléculas de esta enzima también se ve afectado por las situaciones de estrés, añadiendo una regulación adicional al complejo proceso de síntesis de catecolaminas (Mueller y col., 1969b, 1969a). Después, la DOPA descarboxilasa transforma la L-DOPA en dopamina, requiriendo piridoxal fosfato (la forma activa de la vitamina B6) como coenzima. La dopamina entra en las vesículas secretoras por un antiportador (VMAT-vesicular monoamine transporter), a costa de sacar H^+ en contra del gradiente generado por una H^+ -ATPasa. La concentración de H^+ , por tanto, es mayor en el interior de las vesículas, que tienen un pH de 5.5 aproximadamente. La dopamina es transformada en noradrenalina por la dopamina- β -hidroxilasa (DBH) que se encuentra unida a la cara interna de la membrana de las vesículas secretoras, utilizando ácido ascórbico y cobre como cofactores. Finalmente, sólo en las células adrenérgicas, la noradrenalina se transforma en adrenalina mediante la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT). En la glándula adrenal la fabricación de esta enzima parece inducirse por los glucocorticoides liberados de la corteza que llegan a través de los capilares a la médula bañando las células cromafines.

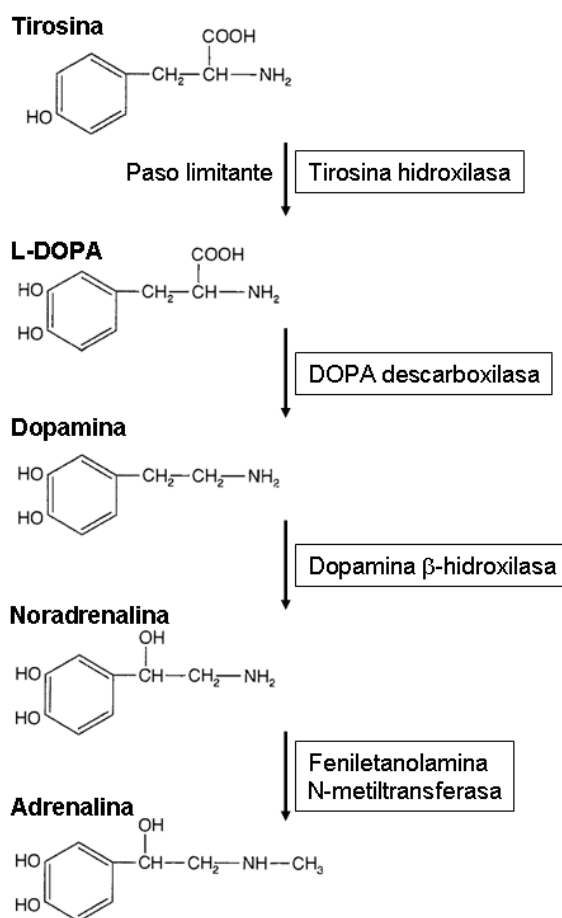


Figura 2. Biosíntesis de las catecolaminas.

La vida media de las catecolaminas en sangre circulante es de unos pocos minutos. La monoamino oxidasa (MAO) es la principal enzima responsable de la degradación de las catecolaminas (Blaschko, 1954) y se inhibe con anfetaminas e inhibidores específicos. Una deficiencia en MAO puede derivar en niveles peligrosamente elevados de catecolaminas, que también pueden ser causados por un tumor neuroendocrino en la médula adrenal: el feocromocitoma.

El conocimiento de la ruta de síntesis de las catecolaminas ha permitido crear anticuerpos específicos contra las enzimas que la componen; de esta manera se pueden identificar y diferenciar las células catecolaminérgicas adrenérgicas y noradrenérgicas (véase el apartado 1 de Resultados).

5.- Excitabilidad de la célula cromafín

Las propiedades eléctricas de la célula cromafín se comenzaron a estudiar a finales de los años 60 cuando Douglas y sus colaboradores midieron los cambios en el

potencial de membrana debidos a la perfusión de acetilcolina (AC) o de soluciones con diversa composición iónica (Douglas y col., 1967b, 1967a). En la Tabla 1 se detallan las técnicas empleadas así como los resultados obtenidos en la veintena de trabajos que han medido el potencial de membrana y el disparo de potenciales de acción hasta la fecha en la célula cromafín de distintas especies animales.

En los primeros estudios se describen potenciales de reposo bastante despolarizados (de entre -10 y -30 mV), debido a que se empleaban técnicas de registro de electrodo intracelular que dañaban la membrana y abrían un flujo de iones en las zonas próximas al electrodo. Con las técnicas de patch-clamp (Hamill y col., 1981), estos problemas desaparecieron y se lograron registros mucho más precisos. Los primeros registros de potencial de membrana con patch-clamp se hicieron en célula cromafín bovina encontrando valores de entre -50 y -80 mV (Fenwick y col., 1982a).

El disparo de potenciales de acción por la célula cromafín se consiguió registrar casi 10 años después de los primeros trabajos de Douglas y colaboradores. Se obtuvieron en células cromafines humanas y de jerbo por Biales y colaboradores (1976). Este grupo también registró potenciales evocados por inyección de pulsos de corriente despolarizantes.

La acetilcolina es el principal estímulo fisiológico secretagogo de catecolaminas en la médula adrenal. Por lo tanto el estudio sobre sus efectos en la excitabilidad de la célula cromafín es de gran interés. Varios de los trabajos citados en la Tabla 1 han comprobado el efecto de distintas concentraciones de este agonista colinérgico fisiológico sobre la excitabilidad de la célula cromafín. Douglas y col (1967 a, b) describieron la forma en que la perfusión de AC disminuía el potencial de reposo aproximadamente a la mitad en células cromafines de jerbo. Efectos similares se observaron también en células cromafines de rata (Brandt y col., 1976, Kidokoro y col., 1982) y ratón (Nassar-Gentina y col., 1988). La AC también indujo el disparo de potenciales de acción a bajas concentraciones (Kidokoro y col., 1982). Fenwick y colaboradores (1982) calcularon que los canales sensibles a AC tenían una conductancia de 44 pS usando la configuración de célula adherida de la técnica de patch-clamp.

Tabla 1. Propiedades de la excitabilidad de la célula cromafín en distintas especies de mamíferos.

<i>Autores. Año</i>	<i>Especie. Preparación</i>	<i>Técnica</i>	<i>Potencial de reposo (mV)</i>	<i>Potenciales de acción</i>
Douglas et al., 1967a, b	Jerbo Cultivo celular 6 – 10 h	Microelectrodo intracelular	Em: -29.3 ± 0.2 mV AC (10^{-4} M) disminuyó el Em un 54.1%	No
Mathews, 1967	Conejo, rata, gato Adrenales biseccionadas Neonato hasta 4 semanas	Microelectrodo intracelular	Em: Conejo: -24.2 ± 0.58 mV Rata: -20.4 ± 0.57 mV Gato: -31.7 ± 1.30 mV	No
Fawcett, 1969	Adrenal de rata <i>in vivo</i>	Microelectrodo intracelular	Valores de Em muy bajos	No
Biales et al. (1976)	Jerbo Cultivo celular 1-3 días mínimo Humano Cultivo celular Jerbo rodaja	Microelectrodo intracelular	300 células exploradas Pocas: -50 a -70 mV Mayoría: -10 a -40 mV La aplicación iontoforética de AC despolariza la célula	PA espontáneos Anchura media: 2 ms PA se bloquean por TTX, Ca^{2+} -independientes Aplicación iontoforética de AC produce PA superpuestos sobre la despolarización de la membrana
Brandt et al., 1976	Rata Cultivos con clones celulares 1-7 días	Microelectrodo intracelular	Em: -49 ± 6 mV Sin Na^{+} : -63 ± 9 mV Aplicación iontoforética de AC produce una despolarización transitoria	PAs evocados por inyección de corriente AC produce PA superpuestos sobre la despolarización de la membrana Bloqueo PA por TTX ($1 \mu M$) Ausencia de Na^{+} bloquea PA PA con un componente Ca^{2+} (Ba^{2+})- dependiente (0.1 Hz) AC aumentó frecuencia PA a 2 Hz Bloqueo de PA por atropin a (10^{-7} M) pero no por hexametonio (10^{-3} M) ni por d- tubocurarina (10^{-5} M)
Kidokoro y Ritchie, 1980	Rata Cultivo celular 2-3 días	Extracelular Registro con un microelectrodo de succión		K^{+} (10-20 mM) aumentó la frecuencia de disparo de PA espontáneos de 0.1 Hz hasta 2 Hz. TTX (6 μM) abolió el incremento

Tabla 1. (Continuación)

Autores. Año	Especie. Preparación	Técnica	Potencial de reposo (mV)	Potenciales de acción
Kidokoro et al., 1982	Rata Cultivo celular 2-7 días	Registro intracelular	Em: entre -39 y -48 mV AC inyectada a presión (100 μ M) causó una despolarización en función de la presión aplicada AC produce fluctuaciones del Em La muscarina y la pilocarpina no afectaron al EM La nicotina producía despolarización que era antagonizada por hexametonio	Despolarización producida por AC con PA s superpuestos. En algunas células el Em fluctuaba y se disparaban PA espontáneos
Fenwick et al., 1982	Bovino Cultivo celular 1-8 días	Patch-clamp Configuraciones de célula adherida y célula completa	Em: entre -50 y -80 mV Fluctuaciones de unos 5 mV	La apertura de canales únicos de AC (4.4 pS) en célula adherida producía PA PA evocados por inyección de corriente (alcanzaban los +25 mV, con una velocidad de ascenso de 50 v/s y una pronunciada post-hiperpolarización hasta -85 mV)
Friedman et al., 1985 Nassar-Gentina et al., 1988	Bovino Células cromafines aisladas Ratón Adrenales biseccionadas (células cromafines <i>in situ</i>)	Sondas sensibles a cambios de voltaje Registro intracelular	Em: alrededor de -55 mV Em: -54.3 ± 8.8 mV AC (100 μ M) causaba una despolarización de 20 mV que era bloqueada por atropina pero no por d-tubocurarina	PA espontáneos en 50% de las células Trenes de PA evocados por inyección de corriente AC (200 μ M) produjo varios PA Los PA eran dependientes de Na^+ y de Ca^{2+}
Iijima et al., 1992	Rata Rodaja adrenal	Sonda sensible a voltaje Estimulación de campo		Estimulación presináptica evocaba PA en la célula cromafín Estimulación nicotínica producía PA en la célula cromafín

Tabla 1. (Continuación)

<i>Autores. Año</i>	<i>Especie. Preparación</i>	<i>Técnica</i>	<i>Potencial de reposo (mV)</i>	<i>Potenciales de acción</i>
Holman et al., 1994	Cobaya Adrenal biseccionada	Electrodo intracelular Estimulación de campo	Em: -60.9±0.5 mV	No se registran PA espontáneos Las células sí responden con PA a la estimulación eléctrica. La estimulación del nervio esplácnico (0.3 -30 Hz) produce el disparo de PA que no se desensibilizan a frecuencias de entre 1 y 22 Hz.
Hollins e Ikeda, 1996	Rata Cultivos celulares 3-4 días	Patch-clamp en célula entera	Em: -62±3 mV	Inyecciones cortas de corriente produce 1-2 APs Inyecciones largas producen trenes de PA cada vez menores La TTX redujo la amplitud de los PA Disparo de PA espontáneos (0.4 Hz)
Zhang et al., 1997	Rata Cultivos celulares 2 semanas	Microelectrodo intracelular y registro extracelular	Em: -45.9±1.9 mV	
Lovell and McCobb, 2001	Rata Cultivos celulares 1-4 días	Patch -clamp en parche perforado		Inyecciones de corriente de 2s produjo trenes de unos 10 PA a 5 Hz.
Wallace et al., 2002	Bovino Cultivos celulares 2-5 días	Patch-clamp en parche perforado	Em: -52±0.9 mV Fluctuaciones de unos 5 mV	Disparo de PA espontáneos (0.21 Hz, Pronunciadas post-hiperpolarizaciones Amplitud de PA de 64.5 mV Na ⁺ y Ca ²⁺ - dependientes Disparo espontáneo de PA (25% de las células) Salvas de PA ante despolarizaciones prolongadas TEA produjo el disparo de salvas de PAs
Micheletti et al., 2005	Rata Cultivos celulares 1-4 días	Patch-clamp Parche perforado		
Orozco et al., 2006	Bovino Cultivos celulares 2-4 días	Patch-clamp parche perforado	Em: -52±1.2 mV	
De Diego et al., 2008	Bovino Cultivos celulares 2-4 días	Patch- clamp Parche perforado		Algunos PA espontáneos PA no desensibilizantes con pulsos de AC aplicados a 0.2 Hz.

6.- El proceso de exocitosis en la célula cromafín

Las células secretoras reciben un estímulo que inicia la cadena de sucesos que acaba produciendo la secreción. Este proceso fue bautizado por W. W. Douglas (1968) con la expresión “acoplamiento estímulo-secreción”. Douglas además propuso que el ión Ca^{2+} era el segundo mensajero encargado de enlazar el estímulo con la liberación de sustancias en las células que lo hacen por exocitosis.

En el proceso de exocitosis, el contenido de las vesículas secretoras se expulsa al espacio extracelular cuando las membranas de vesícula y plasmalema se fusionan, abriéndose un poro por el que difunden las sustancias almacenadas en las vesículas a gran concentración. En la célula cromafín, la acetilcolina estimula los receptores nicotínicos ionotrópicos de la membrana plasmática, que abren un poro por el que pasan cationes que despolarizan la membrana desde su potencial de reposo, algo más negativo de -50 mV (véase apartado 2 de Resultados) hasta el umbral de activación de los canales de Na^+ ; en este momento se inicia el disparo de un potencial de acción que despolariza rápida y transitoriamente la membrana invirtiendo su polaridad durante unos milisegundos y llegando a alcanzar los +20 o +30 mV. A estos niveles de despolarización, los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes se activan permitiendo el rápido paso de cationes Ca^{2+} a su través, a favor de un gradiente electroquímico (la $[\text{Ca}^{2+}]$ es de 100 nM en el interior celular y de unos 2 mM en el exterior), que disparan el proceso de fusión de vesículas a la membrana.

La célula cromafín contiene entre 20.000 y 30.000 vesículas de núcleo denso (Burgoyne, 1995, Plattner y col., 1997) que expulsan su contenido al exterior celular por un proceso de exocitosis que depende de Ca^{2+} . Antes de que pueda llevarse a cabo, las vesículas han de transportarse y sufrir una serie de procesos de maduración, en los cuales el Ca^{2+} , el ATP o ambos, juegan un papel fundamental (R. W. Holz y col., 1989, Bittner y Holz, 1992, Sorensen, 2004). Se han propuesto varios modelos que explican estos procesos agrupando las vesículas cromafines en distintas poblaciones de acuerdo con el estadio de maduración (entendiendo que una vesícula está “madura” si cumple los requisitos necesarios para que se produzca la exocitosis) en que se encuentren. Von Rüden y Neher (1993) proponen que habría una población de vesículas de reserva que se trasladarían hacia la membrana donde sufrirían un proceso de “atraque”. Las vesículas atracadas formarían la población preparada para la exocitosis y estarían a la espera de que se incremente la $[\text{Ca}^{2+}]$ para sufrir exocitosis de inmediato. El transporte de una a otra población sería bidireccional y dependería de Ca^{2+} . Estudios posteriores

han refinado este modelo, añadiendo más estadios que caracterizarían a las distintas poblaciones de vesículas, al menos en términos funcionales, e identificando algunos de los responsables moleculares de la transición entre unas y otras. En los modelos más recientes se habla de vesículas de reserva y atracadas (“docked”), que a su vez estarían no preparadas (“unprimed”) o preparadas (“primed”) para la exocitosis y que serían capaces de liberar su contenido por exocitosis lenta o rápidamente (Sorensen, 2004) (Fig. 3).

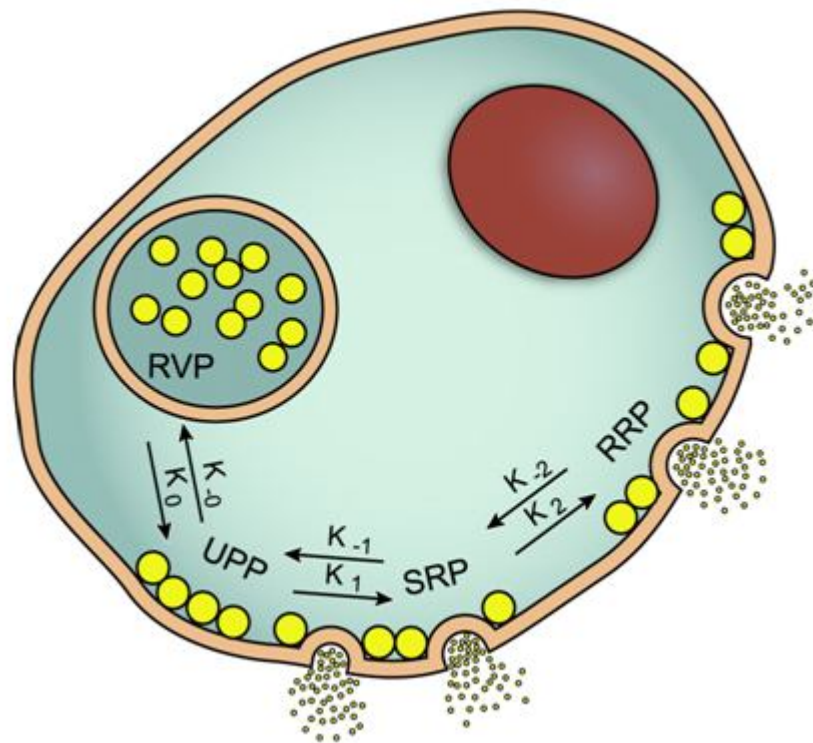


Figura 3. Esquema propuesto de las distintas poblaciones de vesículas en la célula cromafín. Se ha propuesto el dividir conceptualmente las vesículas en poblaciones siguiendo un criterio que las agruparía de acuerdo a las distintas etapas que tienen que pasar hasta que están listas para la exocitosis (Tomado de García y col. 2006).

El proceso de fusión de las vesículas a la membrana plasmática parece estar controlado por un conjunto de proteínas, algunas de ellas localizadas en la vesícula (sinaptobrevina) y otras en el plasmalema (SNAP25 y syntaxina), que forman el llamado complejo SNARE encargado de realizar la fusión. Anclada en las membranas de las vesículas se encuentra además la proteína sinaptotagmina, que se activa con el Ca^{2+} y que se ha propuesto como posible sensor de este catión encargado de comenzar el proceso de fusión (Sorensen y col., 2003). El descubrimiento de varias neurotoxinas que paralizan la neurotransmisión junto con la identificación de sus dianas altamente selectivas, como por ejemplo la toxina botulínica (una proteasa cuyas isoformas

hidrolizan selectivamente alguna de las proteínas SNARE impidiendo la fusión de las vesículas al plasmalema), ha permitido utilizarlas como potentes herramientas farmacológicas que han ayudado a esclarecer algunos de los pasos en el complejo entramado molecular del proceso de exocitosis.

Sin embargo, las bases moleculares del proceso exocitótico están lejos de haberse esclarecido. Se han identificado numerosas familias de proteínas en las vesículas y plasmalema, como las familias MUNC o RAB, con decenas de miembros que pueden participar en alguno de los numerosos pasos de preparación previos a la fusión o en la misma fusión.

7.- Modulación de las corrientes de Ca^{2+} , la respuesta secretora y la excitabilidad

Las vesículas secretoras almacenan gran variedad de moléculas además del neurotransmisor principal. Algunas de estas sustancias son necesarias para la biosíntesis del neurotransmisor (como por ejemplo la DBH en la vesícula cromafín) y otras se ha propuesto que ayudan a que la molécula principal alcance concentraciones mucho más altas en el interior de la vesícula que en el citoplasma, salvando problemas osmóticos (como por ejemplo la cromogranina A en la vesícula cromafín). Estas sustancias también difunden fuera de la célula en el proceso de exocitosis, modulando la respuesta de la propia célula secretora y la de la célula postsináptica.

Los efectos de las sustancias co-almacenadas en las vesículas secretoras sobre las corrientes de Ca^{2+} se estudiaron intensamente a partir de las primeras observaciones sobre la modulación de las corrientes de Ca^{2+} por varios neurotransmisores hechas por Dunlap y Fischbach (1981). Algo más tarde se demostró que dicha modulación afectaba a los canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación y no a los de bajo umbral de activación (Deisz y Lux, 1985). El número de neurotransmisores que se descubrió que modulaban la corriente de Ca^{2+} aumentó rápidamente, y el interés por conocer los engranajes de la maquinaria de tal modulación desembocó en la demostración de que se trataba de un mecanismo circunscrito a la membrana de la célula, mediado por la actuación directa de proteínas G sobre los canales de Ca^{2+} (G. G. Holz y col., 1986). La sustancia moduladora se une a un receptor de membrana acoplado a proteína G; se cree que esta unión hace que una de las subunidades de la proteína G se separe y bloquee parcialmente el canal de Ca^{2+} , reduciendo así la corriente que fluye por él. También se demostró que esta modulación era voltaje-dependiente. Si a una corriente modulada se

le aplicaba un breve y fuerte pulso despolarizante antes del pulso test para medir la corriente de Ca^{2+} , la inhibición de la corriente desaparecía (Fig. 4).

Las vesículas de la célula cromafín almacenan, entre otras sustancias, grandes cantidades de nucleótidos y opioides (Winkler y col., 1987) que han demostrado ser potentes moduladores de la corriente de Ca^{2+} . La perfusión de ATP inhibía la corriente de Ca^{2+} y enlentecía la cinética de activación, efecto que podía revertirse mediante la aplicación de fuertes prepulsos despolarizantes. Además la diálisis de la célula con $\text{GDP}\beta\text{S}$, que inhibe de forma competitiva la activación de la adenilato ciclasa por GTP, impedía la modulación que era emulada por la diálisis con $\text{GTP}\gamma\text{S}$ un activador no hidrolizable de las proteínas G (Gandia y col., 1993). Todos estos datos apuntaban a una modulación mediada por un receptor purinérgico P2Y. Posteriormente se comprobó que los opioides metionina-enkefalina y leucina-enkefalina también ejercían un efecto modulador mediado por un mecanismo similar (Albillos y col., 1996a). En un intento de acercamiento a la situación fisiológica, se perfundió un lisado soluble de vesículas cromafines, obtenido por purificación de vesículas de las propias células cromafines, sobre células cromafines bovinas y se midieron las corrientes de Ca^{2+} comprobando que el contenido vesicular también ejercía una fuerte modulación (Albillos y col., 1996b). En un paso más hacia la fisiología, se manipularon las condiciones del sistema de perfusión. Cuando la perfusión se paraba, los propios productos de secreción de agrupaciones de células plantadas a alta densidad se acumulaban en las inmediaciones de las células y modulaban la corriente; esta modulación se revertía por un fuerte prepulso despolarizante y desaparecía al poner de nuevo en marcha el sistema de perfusión (Hernandez-Guijo y col., 1998).

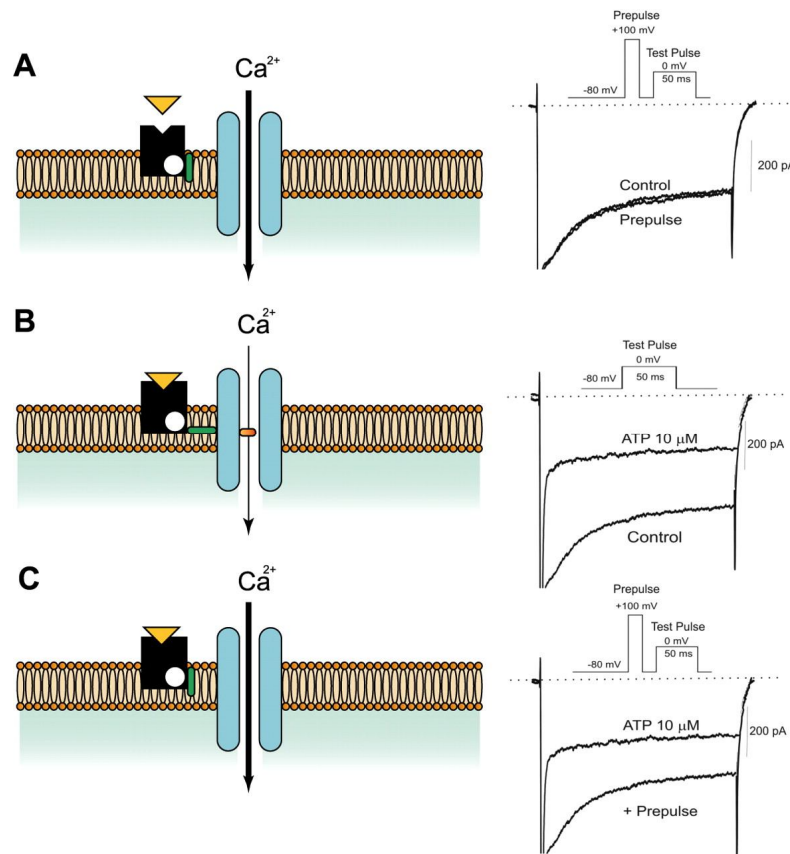


Figura 4. Modulación por ATP y efecto de un fuerte prepulso despolarizante. En el área izquierda se ha dibujado una representación esquemática de la membrana plasmática con un receptor purinérgico y un canal de Ca^{2+} ; en la zona de la derecha se muestran registros originales de corrientes de Ca^{2+} y el protocolo empleado para obtenerlos. Cuando el ATP se une a su receptor (panel B) acoplado a proteína G, una subunidad de la proteína G se separa y bloquea parcialmente el paso de iones por el canal de Ca^{2+} . Este bloqueo puede ser revertido con un fuerte prepulso despolarizante (panel C). Si el ATP no está activando el receptor P2Y el prepulso no tiene efecto sobre la corriente de Ca^{2+} (panel A). (Tomado de Garcia y col., 2006).

Lógicamente, la modulación de las corrientes de Ca^{2+} tiene un efecto inhibitor sobre la secreción de catecolaminas que parece ser proporcional, al menos en la célula cromafín bovina, a la cantidad de Ca^{2+} que entra por cada subtipo de canal (Ulate y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que la modulación por ATP no se limita a los canales de Ca^{2+} ; también hay un efecto modulador si la secreción se induce por elevaciones de Ca^{2+} que no entra por la membrana, como por ejemplo Ca^{2+} liberado del retículo endoplásmico por cafeína (Chen y col., 2005).

Pero la modulación de la célula cromafín no sólo se da de forma autocrina o paracrina por sus propios productos de secreción. Las vesículas de las terminaciones espláncicas también contienen numerosas sustancias, además de la AC, que son liberadas en mayor o menor medida dependiendo de la intensidad de la actividad

esplácnica y que potencialmente puede modular la excitabilidad y por ende la secreción de catecolaminas de las células cromafines. Se ha descrito la presencia de opioides (Schultzberg y col., 1978), péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Hamelink y col., 2002) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) (T. D. Wakade y col., 1991). Estas y otras sustancias pueden contribuir a controlar minuciosamente el patrón de estimulación y secreción de catecolaminas en la médula adrenal.

OBJETIVOS

En el Instituto Teófilo Hernando (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) se cultivan dos áreas de trabajo relacionadas con el sistema nervioso, a saber, neurotransmisión y neuroprotección.

En el laboratorio ITH-1 que dirige Antonio G. García se trabaja desde hace más de tres décadas en temas básicos relacionados con la comunicación neuronal. Esta comunicación acontece a nivel de la sinapsis y tiene como soporte un lenguaje basado en la combinación de señales eléctricas y químicas: un potencial de acción (PA), generado en el soma de una neurona, viaja por su axón hasta llegar a la terminación nerviosa; la despolarización producida por ese PA activa la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) que permiten la entrada de calcio (Ca^{2+}) y la liberación de un neurotransmisor por el mecanismo de exocitosis, consistente en la fusión transitoria de las membranas de la vesícula sináptica y celular y la apertura de un poro por el que el neurotransmisor se libera a la hendidura sináptica.

Los mecanismos que subyacen al fenómeno preciso y rápido de la exocitosis se han estudiado en detalle empleando la célula cromafín de la médula de la glándula suprarrenal como modelo. La célula cromafín forma parte del sistema nervioso simpático, y es considerada una célula postganglionar modificada, muy cercana a la neurona simpática o adrenérgica (se la ha llamado paraneurona para definirla junto con otras células neurosecretoras como las células adenohipofisarias). Desde que en 1968 William Douglas acuñara la expresión acoplamiento estímulo-secreción para definir el proceso de exocitosis que utiliza el Ca^{2+} como mensajero responsable de tal acoplamiento, la célula cromafín ha sido utilizada en numerosos laboratorios de todo el mundo para el estudio de ese lenguaje electroquímico en el que se basa el proceso de la neurotransmisión sináptica. En los últimos 40 años se han estudiado, con técnicas cada vez más precisas, los procesos de la exocitosis de catecolaminas por la célula cromafín. Desde los estudios en glándulas adrenales enteras, pasando por la amperometría en poblaciones de células cuando se logró aislar y cultivar células cromafines, hasta las precisas técnicas de patch-clamp, amperometría y fluorescencia en célula única.

La investigación realizada en esta tesis se enmarca dentro de la línea de investigación básica en neurosecreción que lleva a cabo Antonio García en el laboratorio ITH-1 del Instituto Teófilo Hernando. Como modelo se ha empleado la célula cromafín, especializada en verter grandes cantidades de catecolaminas al torrente sanguíneo cuando la situación lo requiere. A pesar de la ingente cantidad de información disponible, se ha dedicado poco esfuerzo al esclarecimiento de los

mecanismos de funcionamiento en condiciones fisiológicas. La célula cromafín posee receptores para diversos agonistas capaces de inducir la secreción, por ejemplo la histamina, bradicinina o ATP; sin embargo, es la acetilcolina (AC) liberada por las aferencias colinérgicas que recibe de ramas del nervio esplácnico, la que controla con precisión la secreción. La AC produce el disparo de potenciales de acción en la célula cromafín; estos potenciales de acción abren los canales de calcio dependientes de voltaje durante un breve periodo de tiempo permitiendo al Ca^{2+} fluir al interior celular y desencadenar la exocitosis de las vesículas que contienen catecolaminas. Si bien se acepta este mecanismo como cierto, cuando se ha estudiado la secreción raramente se ha tratado de hacerlo en condiciones más o menos fisiológicas. Se han empleado sin embargo fuertes estímulos químicos (por ejemplo despolarizaciones con altas concentraciones de K^+ extracelular, acetilcolina en concentraciones altas y tiempos largos de aplicación) o largos estímulos eléctricos despolarizantes.

El profesor don Pedro Sánchez, que nos visita frecuentemente en el laboratorio ITH-1 y nos anima con nuestra investigación, siempre que lo hace interpela al becario: “¿Cuál es su pregunta?”, qué queremos averiguar con nuestros experimentos. Seguiré su ejemplo y enumeraré los objetivos que se plantean en esta tesis en forma de preguntas comentadas.

El objetivo principal se puede resumir en una pregunta general: ¿cómo funciona la neurotransmisión en la sinapsis esplácnico-cromafín y cómo se produce la liberación de catecolaminas a partir de esos estímulos? Para intentar responderla en la medida de lo posible, nos hemos formulado preguntas más concretas:

- i) ¿Cuál es la organización de la médula adrenal dentro de la glándula y cómo están innervadas las células cromafines? Hemos abordado esta pregunta realizando un estudio histoquímico de la glándula adrenal bovina. Asumiendo que conocer su organización proporcionaría pistas sobre su fisiología, nos valimos de técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para averiguar la distribución espacial de los distintos tipos de células y la innervación de las células cromafines.
- ii) ¿Cómo es la actividad eléctrica de la célula cromafín?, ¿cómo es su actividad en reposo?, ¿cuáles son los requisitos para producir potenciales de acción? Puesto que el disparo de potenciales de acción es el desencadenante de la exocitosis nos pareció de capital importancia averiguar los requisitos necesarios para producirlos a distintas frecuencias. Para ello empleamos la

célula cromafín bovina en cultivo y diversas técnicas como la perfusión rápida de AC, o diversos estímulos eléctricos aplicados por medio de un amplificador de patch-clamp. Pensamos que esto nos proporcionaría mayor conocimiento sobre cómo puede ocurrir la neurotransmisión esplácnico-cromafín *in situ*.

- iii) ¿Qué clase de respuesta exocitótica produce un determinado patrón de estimulación? El siguiente objetivo planteado es la indagación en la relación existente entre la frecuencia de aplicación y número de potenciales de acción y la exocitosis inducida. Se elaboraron distintos patrones de estimulación que se aplicarían empleando las técnicas de patch-clamp que nos permitieron medir las corrientes generadas y los cambios en la capacidad de la membrana proporcionales a la exo-endocitosis. Además se realizó una comparación entre las respuestas exo-endocitóticas y la variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ producidas por trenes de potenciales de acción y las producidas por otros tipos de estímulos despolarizantes previamente usados en numerosos estudios.
- iv) ¿Cómo se modula la respuesta exocitótica? Es conocido que las vesículas secretoras, tanto las cromafines como las de las terminaciones de los nervios esplácnicos, almacenan numerosas sustancias además de los neurotransmisores principales que identifican el tipo de neurona; contienen por ejemplo opioides, ATP, cromograninas o Ca^{2+} . Estas sustancias tienen receptores en las membranas de las células efectoras. Una de sus funciones parece ser la de modular la excitabilidad y por ende la respuesta secretora. Se ha utilizado el ATP y el péptido opioide metionina-encefalina como agentes moduladores para estudiar la modulación de la excitabilidad y la exocitosis de la célula cromafín mediante las técnicas electrofisiológicas de patch-clamp y amperometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cultivo de células cromafines bovinas

El cultivo de células cromafines de la médula adrenal bovina se perfeccionó a finales de la década de 1970 (Livett y col., 1976, Fenwick y col., 1978). Este cultivo produce gran cantidad de células adrenérgicas y noradrenérgicas. Posteriormente se desarrollaron métodos que permitían separar ambos tipos celulares en fracciones enriquecidas en uno de ellos; estos métodos se basaban en el hecho de que las células adrenérgicas tienden a ser algo más densas, lo que se puede aprovechar para separarlas mediante gradientes de centrifugación de renografina y Percoll® (Moro y col., 1990). La purificación no es perfecta, se pueden conseguir fracciones muy enriquecidas en células adrenérgicas (más del 90%), y fracciones que contienen más células noradrenérgicas, aunque no tan enriquecidas (70-80%).

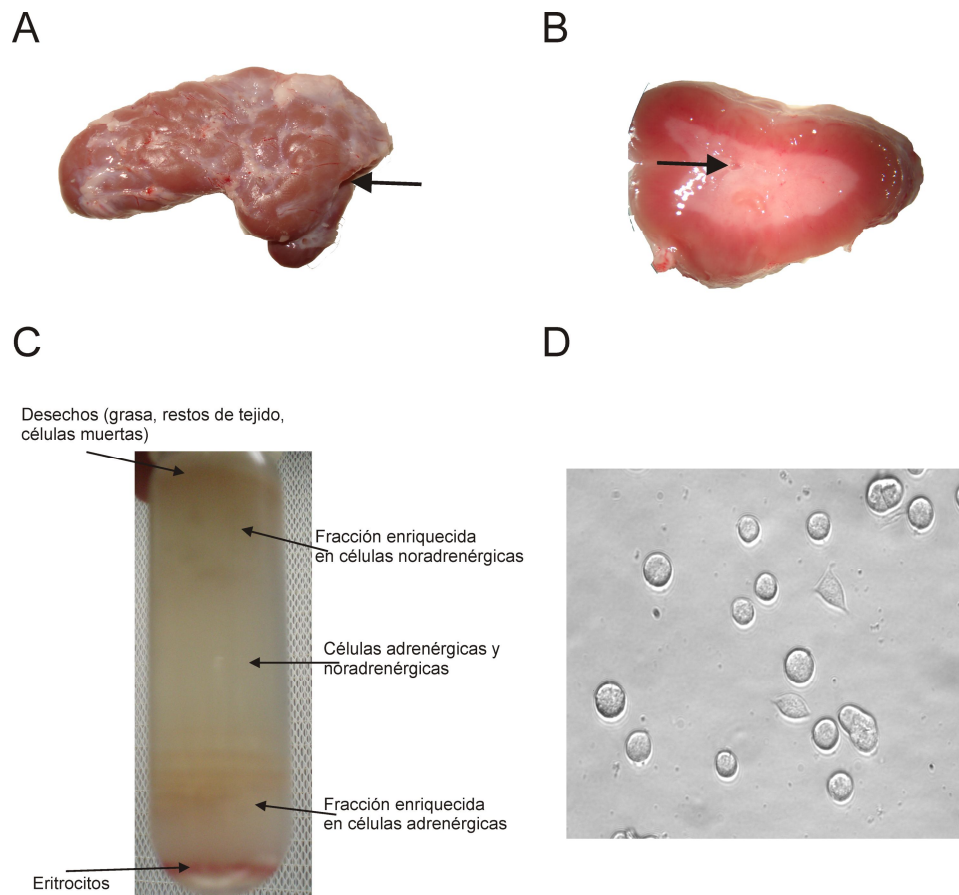


Figura 5. Glándula adrenal bovina, gradiente de percoll y células cromafines en cultivo. La glándula adrenal bovina, una vez limpiada de grasa, tiene un aspecto como el del panel A. Una sección transversal muestra dos zonas bien diferenciadas, la corteza, en color rosa oscuro, que rodea la médula de color blanco (panel B). El panel C muestra un gradiente de densidad de Percoll® (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y la distribución en distintas fracciones que produce la ultracentrifugación del homogenizado obtenido de la médula y filtrado tras la digestión con colagenasa. Panel D, microfotografía de células cromafines bovinas que llevan 24 h en cultivo. (La vena adrenal está señalada con una flecha en los paneles A y B).

El método de cultivo empleado en esta tesis es una modificación del de Moro y col. (1990). Se obtuvieron glándulas adrenales bovinas de los mataderos de Parla o de Sanse, que se sumergieron en una solución de Locke para trasladarlas al laboratorio. Una vez en la unidad de cultivos las glándulas se limpiaron de grasa (Fig. 5A), y se inyectó Locke a 37°C 8-10 veces por la vena adrenal (Fig. 5A, B) para eliminar restos de sangre. Seguidamente se perfundieron 3 ml de una solución de albúmina sérica bovina (2 mg/ml) y colagenasa tipo 1 (1mg/ml, Roche) y se dejó digerir la glándula a 37°C durante 20 min sumergida en Locke. Esta operación se repitió dos veces más. Una vez acabada la digestión, se abrió la glándula con unas tijeras longitudinalmente y se separó la médula de la corteza con la ayuda de un bisturí. Se depositó la médula en una placa con solución Locke y se disgregó con una pipeta *pasteur* de plástico estéril. Se filtró el homogenado a través de una malla de filtro con un poro de 200 µm. Seguidamente se centrifugó en tubos *falcon* de 50 ml a 1000 rpm durante 10 min. Se preparó en un tubo de centrífuga 17.5 ml de Percoll® y 2.5 ml de Locke pH 5. Se resuspendió el precipitado de las células en 20 ml que se depositan cuidadosamente sobre el Percoll® en el tubo de centrífuga. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min a 9°C. Tras la centrifugación se obtiene una distribución en estratos en el tubo de centrífuga (Fig. 5C). La parte superior contiene desechos (detrito, restos de tejido disgregado, grasa, células muertas). Justo debajo hay una fracción enriquecida en células noradrenérgicas, la fracción intermedia contiene ambos tipos de células y la inferior células adrenérgicas. En este momento se puede extraer cuidadosamente con una pipeta *pasteur* cada una de las fracciones y proseguir con el resto del protocolo por separado en cada una de ellas, o bien se pueden mezclar, si no nos interesa separar los distintos tipos de células cromafines. Tras una centrifugación a 800 rpm en DMEM (GIBCO) para lavar el Percoll® el precipitado se resuspendió en 20 ml de DMEM. Se procedió a contar el número de células obtenidas con una cámara de Neubauer y se plantaron a una densidad de 50.000-100.000 células/pocillo en cubres de 13 mm recubiertos de polilisina y 500.000 células/pocillo en cubres de 25 mm recubiertos de polilisina) en DMEM con suero al 8% e inhibidores de la división celular para evitar la proliferación de fibroblastos (fluorodesoxiuridina, L-Leucina metiléster).

2.- Histoquímica, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

2.1. Preparación de secciones de glándula adrenal bovina

Las glándulas adrenales bovinas se perfundieron cuidadosamente a través de la vena adrenal con 100 ml de suero salino (NaCl 0.9%), seguidos de 100 ml de paraformaldehído recién preparado al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4. Se postfijaron en la misma solución de fijación a 4°C y posteriormente fueron troceadas en rodajas, tanto transversales como longitudinales. Algunas rodajas fueron embebidas en parafina y otras fueron crioprotegidas con sacarosa al 30% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 y embebidas en OCT™ (Sakura Finetek) para conservarlas congeladas a -80°C. A continuación, seccionamos las rodajas parafinadas con un microtomo rotatorio (Shandon AS-325-Retraxion) en secciones de 5 µm de grosor. Las rodajas congeladas las seccionamos con un criostato (Leica CM 1950) en secciones de 20 µm. Las secciones de adrenal se colocaron sobre portaobjetos tratados con polilisina (Polysine™, Menzel GmbH & Co KG, Brunswick, Alemania) para facilitar su adhesión. A continuación se detallan las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas que se realizaron sobre las secciones.

2.2. Tinción con hematoxilina-eosina en glándula adrenal bovina

Para observar la estructura histológica de la glándula y como referencia para la observación de las secciones teñidas con la ACE, las inmunohistoquímicas y las inmunofluorescencias, teñimos las secciones con hematoxilina-eosina. Para ello desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Bañamos las muestras con hematoxilina de Harris (15 min), tiñéndose así de azul las estructuras ácidas como los núcleos. Tras 2 lavados en agua destilada, se realizaron 6 pases rápidos en alcohol clorhídrico, un lavado en agua destilada, 4 pases rápidos en agua amoniacal y 4 lavados en agua destilada durante 20 min. A continuación bañamos las muestras en la solución de eosina-floxina durante 4 min, tiñéndose de tonos rosáceos el citoplasma y otras estructuras. Las muestras se deshidrataron en alcohol de 96° y de 100°, se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron los cubreobjetos con DePeX (BDH, Poole, Reino Unido).

2.3. Inmunohistoquímica de TH y PNMT en glándula adrenal bovina

Las muestras se desparafinaron en xilol durante 10 min, se rehidrataron en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y se lavaron en agua destilada. Seguidamente bloqueamos con suero de cabra al 10% en TBS con 0.3% de Triton X-100 durante 3 h e incubamos las muestras a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (generado en ratón frente a la TH de rata, Sigma, dilución 1:300; generado en conejo frente a la PNMT bovina, Chemicon, dilución 1:100). Para inhibir la peroxidasa endógena sumergimos las secciones en H₂O₂ al 3% en metanol. La inmunorreactividad se visualizó incubando con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (generado en cabra frente a ratón y frente a conejo, respectivamente, Chemicon, dilución 1:200) durante 1 h seguido de diaminobenzidina al 0.06%, H₂O₂ al 0.2%. Las muestras se deshidrataron en alcoholes a porcentajes crecientes (70°, 80°, 90°, 100°), se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron los cubreobjetos con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con TBS. Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

2.4. Tinción de acetilcolinesterasa en glándula adrenal bovina

La tinción de la acetilcolinesterasa (ACE) se realizó siguiendo el método de Karnowsky y Roots (1964) que consiste en sumergir las secciones cortadas en el criostato durante 30 min en una solución que contiene acetiltiocolina yodada, que actúa como sustrato para la ACE. La solución contiene además ferrocianuro de potasio y sulfato de cobre. Estas moléculas reaccionan con la tiocolina liberada por la ACE produciéndose un precipitado de color marrón en las zonas donde hay actividad de la ACE. A continuación las muestras se deshidrataron en alcoholes a porcentajes crecientes, se bañaron en xilol durante 1 min y se montaron los cubreobjetos con DePeX.

2.5. Inmunofluorescencia de TH y Hoechst en glándula adrenal bovina

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Seguidamente bloqueamos con suero de cabra al 10% en TBS con 0.3% de Triton X-100 durante 3 h e incubamos las muestras a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (generado en ratón frente a la TH de rata, Sigma, dilución 1:300). La inmunorreactividad se visualizó incubando con anticuerpos secundarios conjugados

con fluoróforos (generados en cabra frente a ratón 1:200) durante 1 h. Contrateñimos las muestras con Hoechst 33342 (Molecular Probes, dilución 1:4000) para ver los núcleos de las células, tanto positivas como negativas, para el anticuerpo dirigido contra TH. Los cubreobjetos se montaron con TBS y glicerol al 50% y se sellaron con laca. Todos los lavados de las muestras los realizamos con TBS. Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

2.6. Inmunofluorescencia de DBH y PNMT en células cromafines en cultivo

Se utilizaron células cultivadas durante 24 h sobre cubres recubiertos con polilisina. La fijación se realizó sustituyendo el medio de cultivo por 1 ml de paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 min. Luego se permeabilizaron las células con tritón al 0.1% en PBS durante 1 min, y se procedió a bloquear los antígenos usando suero bovino fetal al 3% en PBS durante 1 h. Se incubaron las células durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios generados en ratón frente a la DBH o a la PNMT bovinas (Chemicon) con dilución 1:1500. Los secundarios conjugados con un fluoróforo (Alexa fluor, Molecular Probes) se utilizaron a una concentración de 1:1000 en PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se montaron con PBS-glicerol al 50% sobre portaobjetos de cristal. Se realizaron controles negativos consistentes en la incubación de cubres con el mismo protocolo pero sin anticuerpos primarios.

3.- Técnica de amperometría

3.1. Descripción de la técnica

La técnica de la amperometría consiste en acercar un electrodo polarizado a un voltaje superior al potencial de oxidación de las catecolaminas (unos 550 mV) a una célula que libera alguna de estas aminas. Las moléculas liberadas en las inmediaciones del electrodo serán rápidamente oxidadas produciendo especies reducidas y dos electrones que se verán irremediabilmente atraídos hacia el electrodo debido a su potencial positivo. Estos electrones generan una corriente que es amplificada por el amperómetro y registrada en el ordenador. La amplitud y cinética de estas corrientes, que tienen forma de espiga (Fig. 6), proporciona información sobre la concentración y cantidad de moléculas liberadas, y sobre si éstas se han liberado rápida o lentamente, a través de un poro que se ha abierto a distintos diámetros de forma consecutiva. Una espiga representa el contenido de catecolaminas liberado por una vesícula.

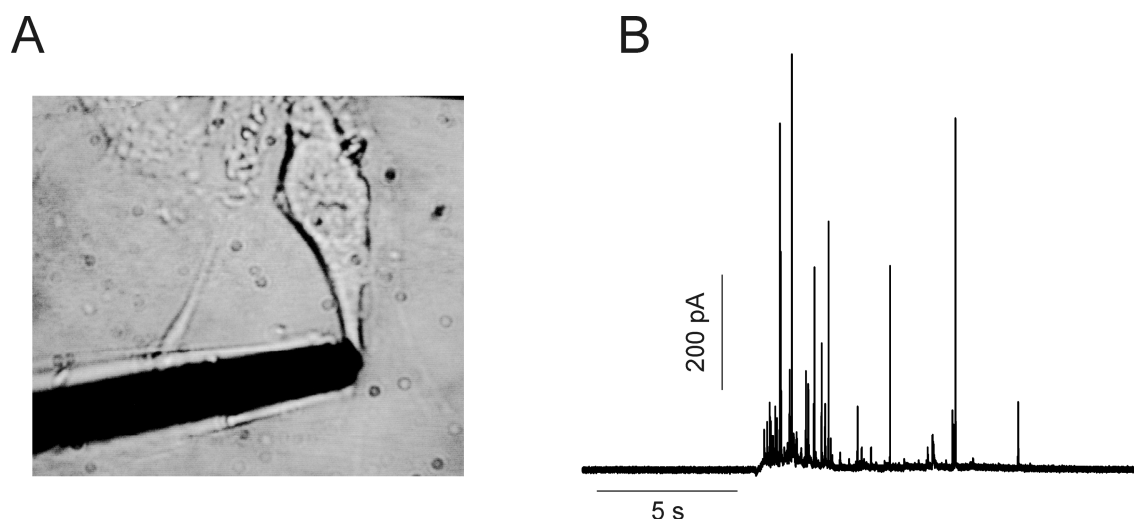


Figura 6. Técnica de amperometría. El panel A muestra una célula cromafín bovina que emite una prolongación sobre la que se ha situado el electrodo de grafito. Se procedió entonces a aplicar un estímulo despolarizante superfundiendo una solución con una alta concentración de potasio que produjo la respuesta mostrada en el panel B.

3.2 Construcción de los electrodos de amperometría

El laboratorio de Wightman (1991) fue el primero en aplicar esta técnica, que se empleaba anteriormente en la identificación de especies químicas por oxidación, a células vivas, valiéndose para ello de la célula cromafín bovina y de un electrodo de grafito de un diámetro de 10 μm . El método utilizado para construir los electrodos de amperometría utilizados en esta tesis es el descrito por Kawagoe y colaboradores (1993). Consiste en introducir el electrodo de grafito en un capilar de vidrio que luego se estira en un estirador de pipetas (Narishige) hasta que se separa en dos pipetas. De las puntas de ambas pipetas separadas sobresale la fibra de grafito. Esta fibra se corta obteniéndose así dos pipetas con sendas fibras de grafito sobresaliendo por la punta. Se prepara una resina epoxi (epikote 828 de Miller-Stiphenson mezclada con un 14% de m-fenildiamina de Sigma) que se calienta al baño maría a 80°C hasta que se convierte en una mezcla homogénea viscosa de color marrón. En este momento se sumergen las puntas de cada una de las pipetas en la resina. Se dejan secar las pipetas 24 h y luego se introducen en un horno durante 2 h a 100°C y otras 2 h a 150°C. La resina queda endurecida y el electrodo terminado. Con esta maniobra se consigue: 1° aislar eléctricamente la fibra de carbono con un recubrimiento de resina y 2° aislar la punta de la pipeta impidiendo el paso de líquidos entre el interior y el exterior de la misma. Puesto que toda la fibra que sobresale de la punta de la pipeta está recubierta de resina, a la hora de hacer un registro se debe cortar la punta para dejar expuesta la zona final conductora de la electricidad que entrará en contacto con la célula.

3.3. Calibrado de los electrodos de amperometría

Para asegurar sensibilidades homogéneas y por lo tanto medidas de amplitud similares entre los registros de unas células y otras, es recomendable calibrar la pipeta con una solución que contiene noradrenalina 50 μM (Machado y col., 2008). Se utilizaron pipetas que, una vez colocadas en nuestro sistema amperométrico (construido en los talleres de la UAM, SEGAINVEX) y posicionadas por medio de un micromanipulador (Narishige, MHW-3) frente a la salida del sistema de perfusión, produjeron una corriente de entre 250 y 300 pA cuando eran perfundidas con esta solución.

4.- Técnica de patch-clamp

4.1. Descripción de la técnica: fijación de voltaje y fijación de corriente

La técnica de *patch-clamp* (Hamill y col., 1981) que se ha traducido como técnica del pinzamiento zonal de membrana, se usa para medir las corrientes iónicas que atraviesan la membrana de la célula. Se trata de incluir en un circuito eléctrico que está conectado a un amplificador a la célula objeto de estudio. Si asumimos que se cumple la ley de Ohm, en este circuito los cambios de voltaje son proporcionales a los cambios en la corriente, siendo la constante de proporcionalidad la resistencia de la membrana. El amplificador puede mantener “fijado” el voltaje del circuito; para ello cuando fluya una corriente debido a la apertura de canales iónicos, se encargará de “compensar” eléctricamente este flujo. Este es el modo de fijación de voltaje y permite medir las corrientes que atraviesan la membrana. Si se ordena al amplificador que no “inyecte” corriente alguna o que inyecte una corriente constante, estaremos en el modo de fijación de corriente con el que podremos detectar los cambios en la diferencia de potencial transmembrana que las corrientes nativas de la célula producen.

El amplificador está conectado a una pipeta que contiene una solución salina y que se acerca a la célula (Fig. 7A) “sellándose” sobre su membrana. En este momento se dice que estamos en la configuración de célula adherida (“cell attached”) (Fig. 7B); la técnica es tan sensible que en esta configuración se puede medir el trasiego iónico a través de un solo canal. Si se ejerce una brusca succión, se puede romper la membrana de la célula justo en la zona rodeada por la punta de la pipeta (Fig. 7C); en este momento el contenido salino de la pipeta se mezcla con el citoplasma y el contenido citoplasmático difunde hacia el interior de la pipeta. Al realizar esta maniobra se pasa a

la configuración de célula entera (“whole cell”), en la que el interior de la pipeta y el citoplasma son un solo compartimento y se pueden medir las corrientes iónicas que pasan por todos los canales de la membrana a la vez. Los experimentos presentados aquí se han realizado con esta técnica.

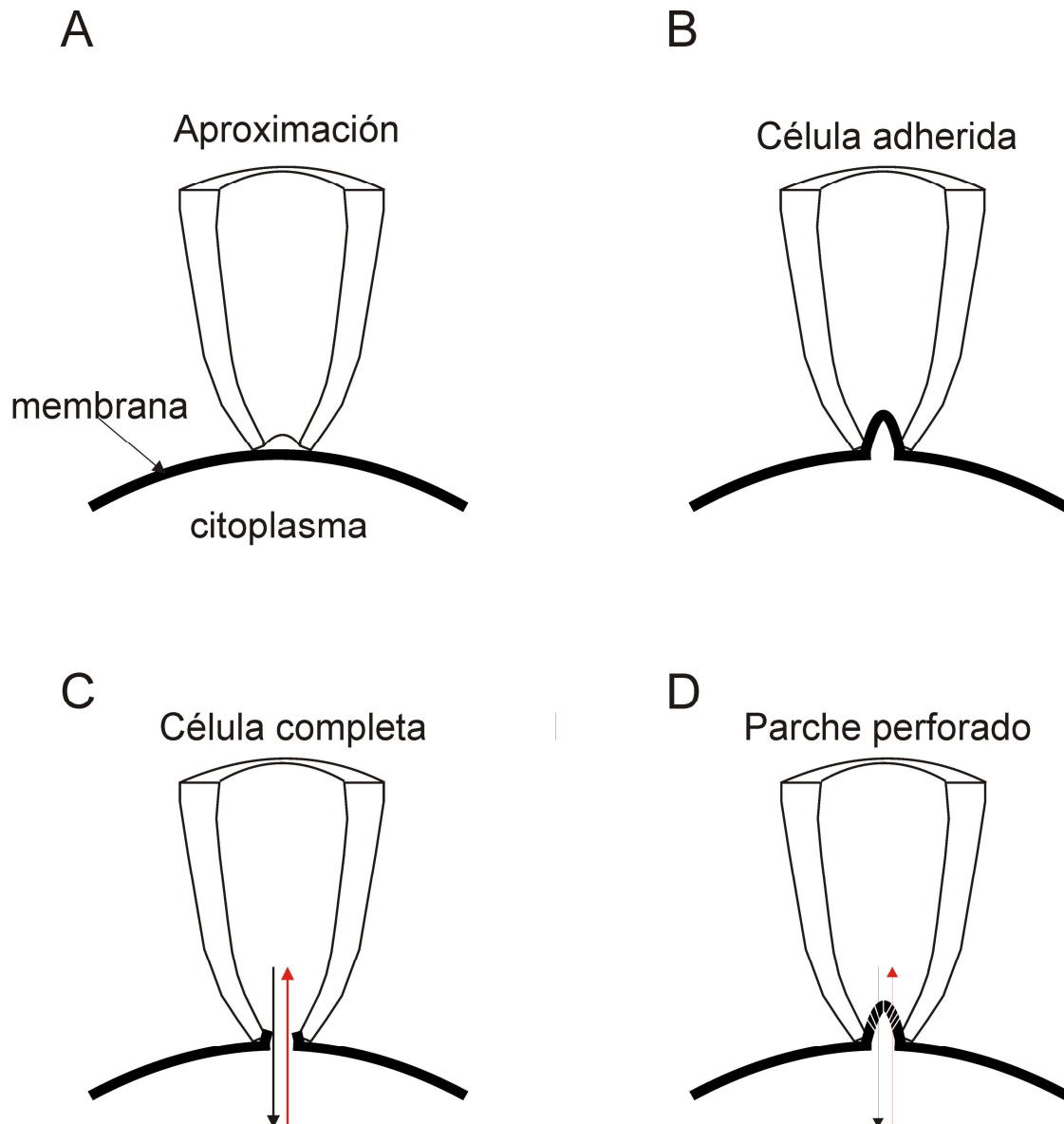


Figura 7. Representación esquemática de los pasos a seguir para lograr un sello y registros de corrientes globales de la célula. Para obtener un sello se aproxima la punta de la pipeta con un micromanipulador a la célula enfocada con el microscopio (panel A). Una vez la pipeta toca suavemente la membrana se realiza una succión hasta que se logra que la membrana obture la punta de la pipeta. Se logra así un sello de varios G Ω de resistencia; en este momento la única corriente que pasa entre los dos polos del circuito es la del flujo de iones a través de los canales iónicos situados justo en la zona del sello cuando se abren; esta es la configuración de célula adherida (panel B). Si se aplica una succión brusca y rápida se rompe la membrana (panel C), y hay un intercambio de iones y moléculas entre la solución de la pipeta y el citosol, la solución

de la pipeta y el interior de la célula forman un solo compartimento, y podemos medir el flujo iónico a través de los canales que se abran en toda la membrana celular. Esta técnica de célula completa tiene el inconveniente de que grandes moléculas del citosol difunden a la pipeta. Este problema se puede solucionar introduciendo un ionóforo, como por ejemplo la anfotericina-B, en la solución de la pipeta; el ionóforo hará poros en la membrana que sólo permitirán el paso de pequeños iones, salvaguardando a la célula de la pérdida de grandes moléculas y por ende de la pérdida de las funciones de las que se encargan pero permitiendo la medida de corrientes y voltajes transmembrana (panel D).

4.2. Variaciones de la capacidad de membrana

La técnica de la medida de los cambios de la capacidad de la membrana (Neher y Marty, 1982) se basa en la idea de que la membrana de la célula actúa como un condensador, que consiste en un aislante (la membrana) separando dos conductores (el citosol y la solución extracelular), y como tal es capaz de almacenar carga cuando se le somete a una diferencia de potencial en un circuito. La cantidad de carga que almacena un condensador es proporcional a la superficie del aislante. En el caso de una célula, si aumenta o disminuye su superficie debido a procesos de fusión o escisión de membranas de vesículas o de otro tipo, aumentará o disminuirá consecuentemente la capacidad del condensador formado por la membrana y las soluciones intra y extracelular. Neher y Marty (1982) utilizaron esta propiedad física para desarrollar un algoritmo que, aprovechando la técnica de patch-clamp, permite calcular los cambios de la capacidad del condensador de la célula a partir del desfase de la respuesta de corriente a un estímulo de voltaje que varía periódicamente según una función determinada.

4.3. Datos técnicos sobre la elaboración de pipetas, capacidad y parche perforado

Las pipetas de patch se obtuvieron a partir de capilares Kimax 51 (Kimble products, EE.UU.) con un “estirador” de pipetas Narishige modelo PC-10 (Narishige, Japón) y se recubrieron las puntas con cera dental (Miltex, Germany). El objetivo de esta manipulación es reducir la capacidad de la pipeta y, por tanto, la corriente que se invierte en cargar el condensador de la pipeta cuando hay un cambio de voltaje. Esta corriente se suele compensar para que no interfiera con los registros de la célula, pero ésta es una maniobra sujeta a errores, y una compensación errónea hace casi imposible los registros de variaciones de capacidad de la membrana, de ahí la necesidad de reducir en la medida de lo posible la capacidad de la pipeta. Finalmente se pulieron aplicando

calor con una microforja Narishige modelo MF-830. La resistencia de las pipetas fue de entre 2.5 y 3 MΩ.

Para el cálculo de los cambios en la capacidad de la membrana se empleó el método “sine + dc” (Lindau y Neher, 1988) con una onda sinusoidal aplicada a una frecuencia de 1 KHz, de una amplitud de 30 mV y se registraron 50 puntos por ciclo.

La técnica de parche perforado (Lindau y Fernandez, 1986, Horn y Marty, 1988), esquematizada en la figura 7D, se realizó utilizando anfotericina-B como ionóforo (Aggett y col., 1982, Rae y col., 1991). Dado que la anfotericina-B dificulta el sellado, la punta de la pipeta se sumergió brevemente en la solución sin anfotericina y luego se rellenó por la parte de atrás con solución con anfotericina (500 µg/ml) que difundía hacia la membrana una vez logrado el sello. Los registros comenzaron entre 10 y 20 min después de lograr el sello, cuando la resistencia en serie descendió por debajo de 30 MΩ en un grupo de las células medidas y de 20 MΩ en el resto.

Se han descrito problemas e imprecisiones con el registro de cambios rápidos en el potencial de membrana, como lo son los potenciales de acción (Magistretti y col., 1996). El amplificador utilizado fue un modelo EPC-10 fabricado por HEKA (Lambrecht-Germany). Este amplificador está diseñado con un circuito de seguimiento de voltaje capaz de registrar con precisión cambios rápidos de potencial de membrana, lo que asegura la máxima precisión con la tecnología disponible. La frecuencia de muestreo de las corrientes y el potencial de membrana fue de 20 KHz.

5.- Medida de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ con la sonda fluorescente Fluo-4

Las variaciones de $[Ca^{2+}]_c$ se midieron por medio de un microscopio de fluorescencia confocal (BIORAD MRC 1024) equipado con un láser de Kr/Ar capaz de emitir luz a 488 nm. La unidad estaba acoplada a un microscopio invertido (NIKON TMD) con un objetivo Plan-Apo 60X de inmersión en aceite y apertura numérica 1.40. Las células se cargaron con la forma metil-éster de la sonda Fluo-4 (Molecular Probes), que permea la membrana celular, durante 45 min a una temperatura de 37°C y a una concentración de 8 µM. Una vez acabado el periodo de incubación, se lavó la muestra dos veces durante 5 min con solución de Tyrode y se dejó a temperatura ambiente otros 15 min para que las esterasas celulares hidrolizaran la molécula y dejaran la sonda activa para captar Ca^{2+} y emitir fluorescencia.

En los experimentos simultáneos con *patch-clamp*, se centró la célula de interés en una ventana de 128x128 píxeles y se dibujó una región de interés que rodeaba la

célula y otra en una zona sin células que servía para identificar posibles cambios en la luz de fondo. A la hora de analizar los datos se substrajo la fluorescencia de fondo. Un disparador del amplificador de *patch-clamp* estaba conectado a la unidad confocal e iniciaba automáticamente el registro de fluorescencia de forma sincronizada con los registros electrofisiológicos.

6.- Sistema de perfusión

Las células se superfundían constante y localmente durante la duración del experimento con una solución Tyrode (véase apartado de soluciones para su composición). El sistema de perfusión, de fabricación manual, estaba compuesto por varias vías que convergían en una salida común. La solución que se quería perfundir se intercambiaba con un sistema de electroválvulas (The Lee Company, Essex) controladas por un controlador de electroválvulas fabricado en los talleres de la UAM (SEGAINVEX). La pipeta de perfusión se colocaba a 50 – 100 μm de la célula estudiada y el intercambio de soluciones se lograba en unos 100 ms.

Para los experimentos de superfusión rápida de AC, se elaboró un sistema de perfusión que utilizaba tubos con un diámetro interno mayor, lo que permitía mayor velocidad de intercambio. Se calibró la velocidad de intercambio de estímulos sucesivos superfundiendo una solución de noradrenalina (NA) 100 μM sobre un electrodo de amperometría 20 veces durante 25 ms cada 1 s. Se situó el electrodo de amperometría al lado de una célula cromafín que servía de referencia para colocarla a la misma distancia del sistema de perfusión a la que se iban a realizar los experimentos. Al llegar la NA al electrodo se oxidó generando una corriente que tardó en promedio 18.9 ± 0.9 ms (media \pm e.e.; n=3 electrodos) en llegar al máximo; este es el tiempo que tarda la solución superfundida en “sustituir” totalmente a la de baño en los alrededores de la célula. La anchura media fue de 36.4 ± 5.9 ms y desde el inicio de la corriente hasta que se lavó completamente la señal pasaron 85.9 ± 8.2 ms.

7.- Soluciones y productos químicos

A continuación se detalla la composición de las soluciones empleadas.

- Solución Locke (en mM): 154 NaCl, 5.5 ClK, 3.6 HNaCO₃, 5.5 glucosa, 10 HEPES; pH 7.3 NaOH.

- Solución Tyrode (en mM): 137 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂; pH 7.35 NaOH.
- Solución parche perforado 1 (en mM): 145 ácido glutámico; 8 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂; pH 7.3 CsOH.
- Solución parche perforado 2 (en mM): 140 KCl; 8 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂; pH 7.3 KOH.
- PBS – solución salina tamponada con fosfato (en mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 8.1 Na₂HPO₄, 14.7 KH₂PO₄; pH 7.35 NaOH.

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo se han adquirido en SIGMA (Madrid) y PANREAC (Barcelona), excepto el suero bovino fetal (PAA, Austria), DMEM (GIBCO-INVITROGEN), los anticuerpos dirigidos a TH y PNMT (Chemicon, Millipore, Billerica, EE. UU.).

8.- Análisis estadístico

Para comparar grupos de datos se emplearon diversos tests. Si los datos se ajustaban a una distribución normal (lo que se comprobó aplicando un test de Kolmogorov-Smirnov) y además cumplían el supuesto de homogeneidad de varianzas (lo que se comprobaba aplicando un test de Levene) se emplearon los siguientes tests paramétricos: el test de Student para comparar 2 grupos o el análisis de la varianza para más de dos grupos seguido de un test *post-hoc* apropiado para averiguar entre qué grupos se encuentra la diferencia y que se indica en el apartado correspondiente. Si las varianzas no son homogéneas y los datos no se ajustan a una distribución normal, se emplearon los siguientes tests no paramétricos: test de Mann-Whitney para comparar dos grupos y test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos seguido de un test *post-hoc* apropiado para averiguar entre qué grupos se encuentra la diferencia y que se indica en el apartado correspondiente. En todos los casos se exigió un nivel de confianza del 95% (p-valor) $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se han llevado a cabo con la ayuda de MS Excel (Microsoft Corporation, Richmond), SPSS (Chicago, Illinois), SigmaPlot (Systat Software Inc, San José, California) e Igor Pro (Wavemetrics, Oregon).

En los casos en que el análisis se haya realizado con alguna particularidad estadística, se detalla en el epígrafe correspondiente.

RESULTADOS

1.- Histología de la glándula adrenal bovina

1.1. La glándula adrenal bovina: Estructura general observada con la tinción histológica de hematoxilina-eosina

La hematoxilina-eosina es seguramente el método de tinción más popular en histología. La hematoxilina tiñe las estructuras ácidas (basófilas) en tonos morado-azulados y la eosina las básicas (acidófilas) en tonos rosáceos. Al aplicarla podemos observar la arquitectura de la glándula adrenal bovina que está organizada en tres partes bien diferenciadas: la cápsula, la corteza y la médula. En la figura 8A se observa un corte transversal de una glándula adrenal bovina. La glándula está recubierta de una cápsula fina de tejido conectivo. Avanzando hacia el interior, la siguiente área, mucho más gruesa que la cápsula, es la corteza, que a su vez se subdivide en zonas especializadas en fabricar diversas hormonas esteroideas. El área central de color morado es la médula, compuesta principalmente de células cromafines. En el centro de la médula hay grandes vasos encargados de drenar las hormonas secretadas al torrente sanguíneo. El mayor de ellos es la vena adrenal.

En la figura 8B se ha encuadrado a mayor aumento una zona en la que se pueden distinguir las tres áreas en que se divide la corteza. En la zona más cercana a la cápsula, las células se organizan formando ovillos encadenados, por lo que recibe el nombre de zona glomerulosa (Fig. 8C); estas células se encargan de la síntesis y liberación de mineralocorticoides (corticosterona, aldosterona). Por debajo, ocupando la mayor superficie de la corteza, se extienden hileras de células de apariencia redondeada, separados por sinusoides y agrupadas en cordones o fascículos (Fig. 8C, D); las células de esta zona fasciculada fabrican los glucocorticoides (cortisol y cortisona). La capa más interna de la corteza, la zona reticular (Fig. 8D), la forman redes de células entrecruzadas separadas por capilares sinusoides; esta capa fabrica pequeñas cantidades de andrógenos.

El área central, la médula adrenal, la forman las células cromafines que sintetizan catecolaminas (principalmente adrenalina y noradrenalina). También hay células ganglionares y fibras nerviosas. Las células cromafines situadas en las zonas más exteriores de la médula forman acinos y cordones rodeados de sinusoides (Fig. 8E, F) estratégicamente organizados para que las catecolaminas lleguen lo más rápidamente posible al torrente sanguíneo y sean transportadas a todo el cuerpo.

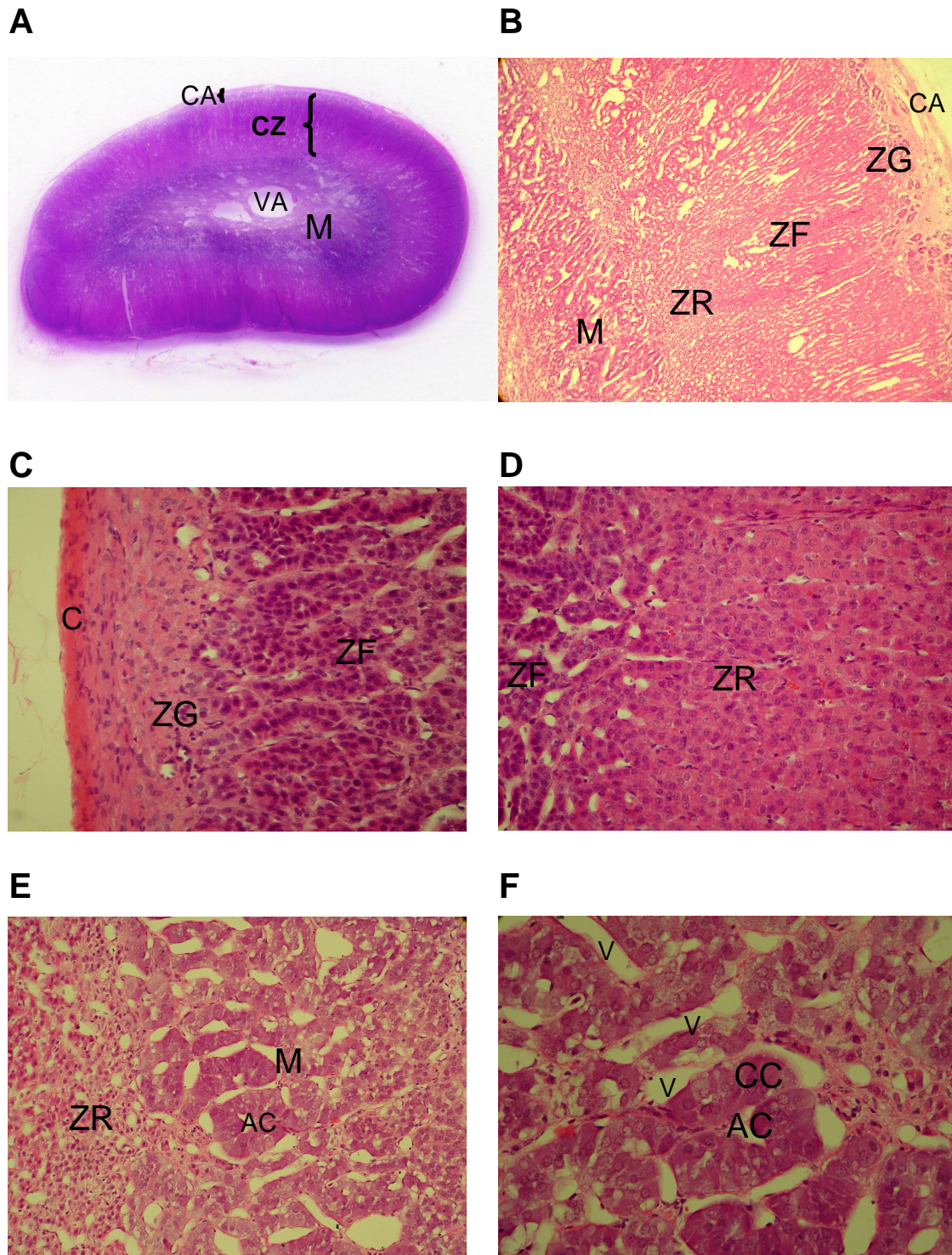


Figura 8. Tinción de hematoxilina-eosina de una sección transversal de glándula adrenal bovina. Varios campos del corte fotografiados a distintos aumentos sirven para ilustrar la arquitectura de la glándula. En el panel A se muestra la sección completa en la que se distinguen cápsula, corteza y médula. En B, se aprecian las tres zonas en las que se divide la corteza, fotografiadas con mayor detalle en C y D. Las células cromafines se organizan en acinos y columnas rodeadas de sinusoides donde descargan las catecolaminas (E, F). AC: acino; CA: cápsula; CC: célula cromafín; CZ: corteza; M: médula; V: vaso; VA: vena adrenal; ZF: zona fasciculada; ZG: zona glomerulosa; ZR: zona reticular.

1.2. Las células cromafines de la médula de la glándula adrenal bovina están especializadas en la liberación de adrenalina y noradrenalina

Las células cromafines de la médula adrenal fabrican noradrenalina y/o adrenalina. Se puede aprovechar el conocimiento sobre las rutas metabólicas de la síntesis de estas catecolaminas (véase introducción) para identificar las células que las fabrican mediante anticuerpos dirigidos contra alguna enzima de la ruta. La tirosina-hidroxilasa (TH), enzima que cataliza la conversión de dopamina en noradrenalina, se encuentra en todas las células que fabrican catecolaminas; por lo tanto servirá para identificar cualquier célula catecolaminérgica. La figura 9A muestra un corte transversal de una glándula adrenal bovina marcada con un anticuerpo monoclonal que reconoce la TH. La TH se encuentra evidentemente localizada en la médula de la glándula. Un corte adyacente al anterior se ha marcado con un anticuerpo dirigido contra la fenil-etanol-amina-N-metil-transferasa (FNMT). Esta enzima cataliza la conversión de noradrenalina en adrenalina. Al igual que la TH, la FNMT se encuentra en la médula adrenal (Fig. 9B).

La TH aparece en todas las células cromafines, aunque la intensidad del marcaje varía considerablemente. (Fig. 9C, E, G). La FNMT sólo se marca en algunas células; nótese en el panel 9F un grupo de células no marcadas, presumiblemente cromafines noradrenérgicas rodeado por otras células cromafines que sí expresan la enzima FNMT (adrenérgicas). La mayor densidad de expresión de FNMT parece encontrarse en las células cercanas a la corteza (Fig. 9D). Parece ser que los glucocorticoides procedentes de la corteza podrían hasta la médula estimulando la expresión de esta enzima (Coupland y MacDougall, 1966), esto podría explicar una mayor densidad de estas células en las zonas cercanas a la corteza.

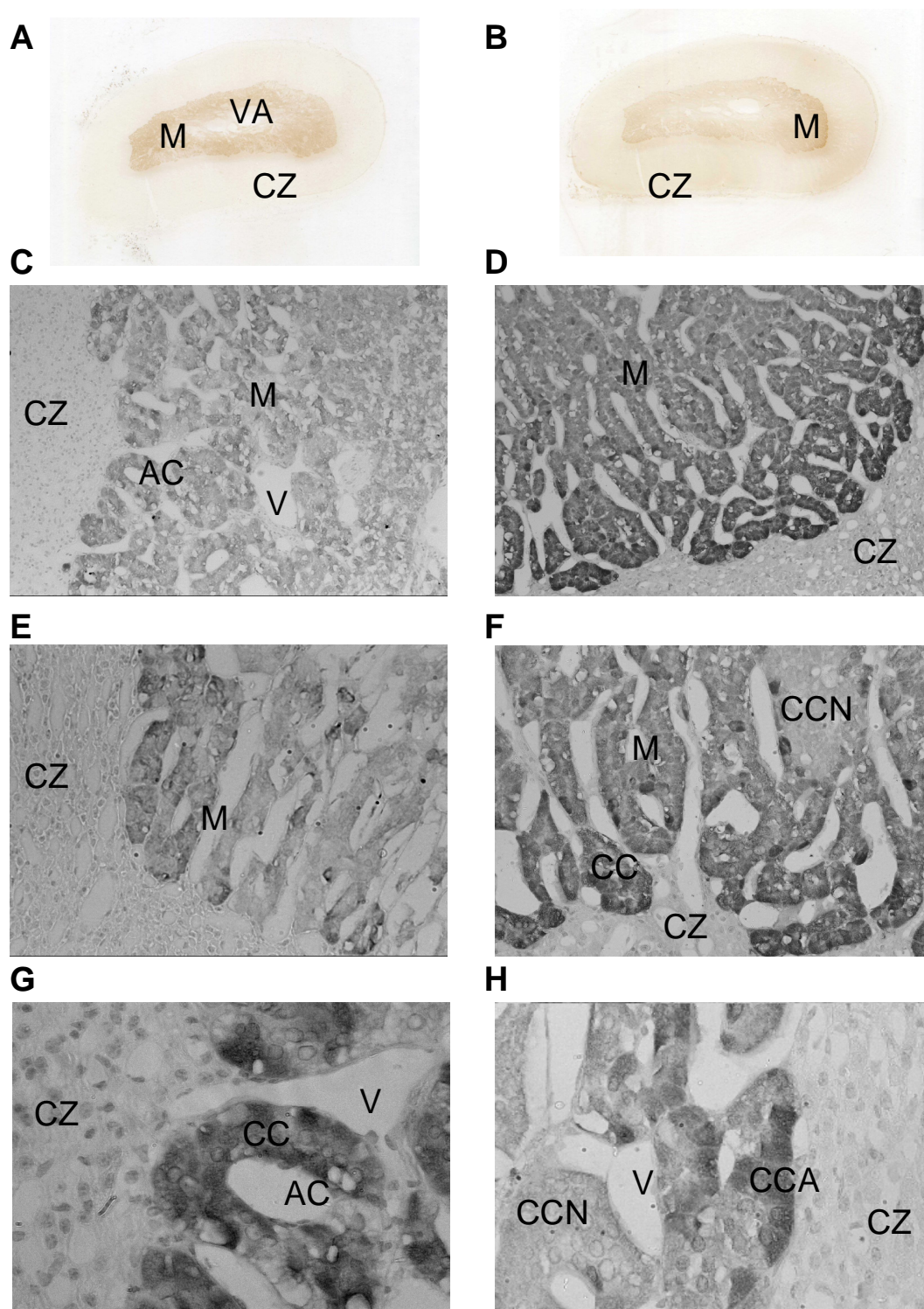


Figura 9. Células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas. Los paneles A, C, E y G muestran microfotografías a distintos aumentos del marcaje con TH. Las microfotografías de los paneles B, D, F y H muestran inmunohistoquímicas de la FNMT. Nótese como hay grupos de células que no tiñen FNMT (paneles F, H). AC: acino; CCA: células cromafines adrenérgicas; CCN: células cromafines noradrenérgicas; CZ: corteza; M: médula; V: vaso; VA: vena adrenal.

1.3. Las células cromafines están polarizadas

La respuesta de “lucha o huida” inunda el torrente sanguíneo de catecolaminas en cuestión de segundos. Dos hechos determinan esta velocidad: i) el que se produzca por estimulación nerviosa, garante tanto de rapidez como de control preciso y ii) la disposición espacial de las células y vasos en el parénquima de la médula adrenal.

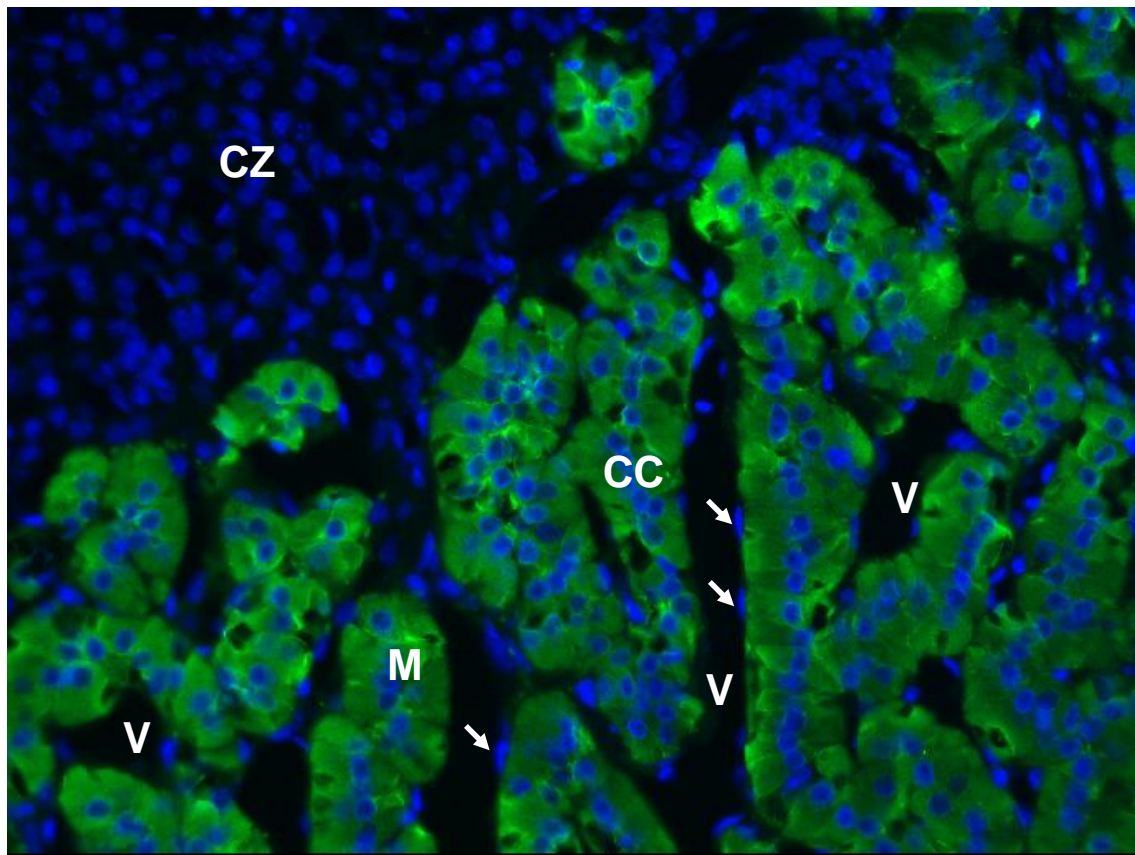


Figura 10. Inmunofluorescencia con TH y Hoechst de un corte de glándula adrenal bovina. Los núcleos de todas las células están teñidos de azul y las células cromafines de verde. Las flechas señalan los núcleos aplanados de las células las endoteliales de la íntima vascular. CC: células cromafines; CZ: corteza; M: médula; V: vaso.

El punto i) se discutirá en epígrafes posteriores. La disposición del tejido adrenomedular se ilustra en la figura 10. La microfotografía está tomada en la frontera de la médula con la corteza adrenal. Se trata de una inmunofluorescencia con un anticuerpo dirigido contra la TH que sólo se adhiere a las células que sintetizan catecolaminas, al que se ha unido un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo verde, de modo que en este color se aprecian las células cromafines de la médula adrenal. Después se ha contrateñido con Hoechst, en color azul, que tiñe los núcleos de todas las células. Para facilitar la rápida liberación de las catecolaminas al torrente sanguíneo, las vesículas secretoras se acercan a la zona de la membrana plasmática que

se encuentra en contacto directo con los capilares (Aunis y Garcia, 1981). Esta disposición queda patente en la figura 10: nótese como los núcleos redondeados de las células cromafines se sitúan en el centro de los acinos e hileras de cuerpos celulares, mientras que el resto del citoplasma se extiende hacia los vasos.

1.4. Las células cromafines están innervadas por fibras nerviosas colinérgicas

Las células cromafines están innervadas por fibras colinérgicas provenientes de principalmente de ramas del nervio esplácnico mayor, pero también de los esplácnicos menores y los ganglios celíacos lumbares. Esta innervación no se ha observado en detalle en cortes histológicos de glándula adrenal bovina. Se hicieron cortes transversales y longitudinales que se tiñeron con la técnica de la acetilcolinesterasa (ACE) descrita por Karnowsky y Roots (1964). La ACE es la enzima que degrada la acetilcolina y está presente en las vías colinérgicas. En la figura 11A y 11B se puede observar un patrón espacial de tinción similar al de la tirosina hidroxilasa descrito anteriormente, ya que el marcaje de la ACE se localiza en el tejido adrenomedular.

Si se observan los cortes a un mayor aumento, se pueden identificar algunas fibras nerviosas en la corteza, sobre todo en áreas cercanas a la médula. En una búsqueda minuciosa algunas fibras finas se podían observar recorriendo la corteza y acabando en la médula; estas fibras eran muy escasas. En las secciones transversales, gruesos tractos nerviosos compuestos de axones colinérgicos y cortados transversalmente se marcaban intensamente como conjuntos de puntos rodeados por una membrana (Fig. 11C). En las secciones longitudinales sin embargo, los tractos nerviosos de la médula aparecían cortados longitudinalmente y embebidos en tejido conectivo (Fig. 11D). Las fibras colinérgicas formaban plexos que se distribuían entre las células cromafines de los acinos. Se podían observar botones terminales y botones “en passant” (véase Fig. 11E, F, G, H).

Las células cromafines también se marcaron de forma difusa indicando la presencia de ACE. Este marcaje es consistente con trabajos previos en los que, aislando fracciones de membranas de diversas organelas, se identifican la presencia de varias isoformas de ACE en la membrana plasmática, el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico (Bon y col., 1990, Michaelson y col., 1994).

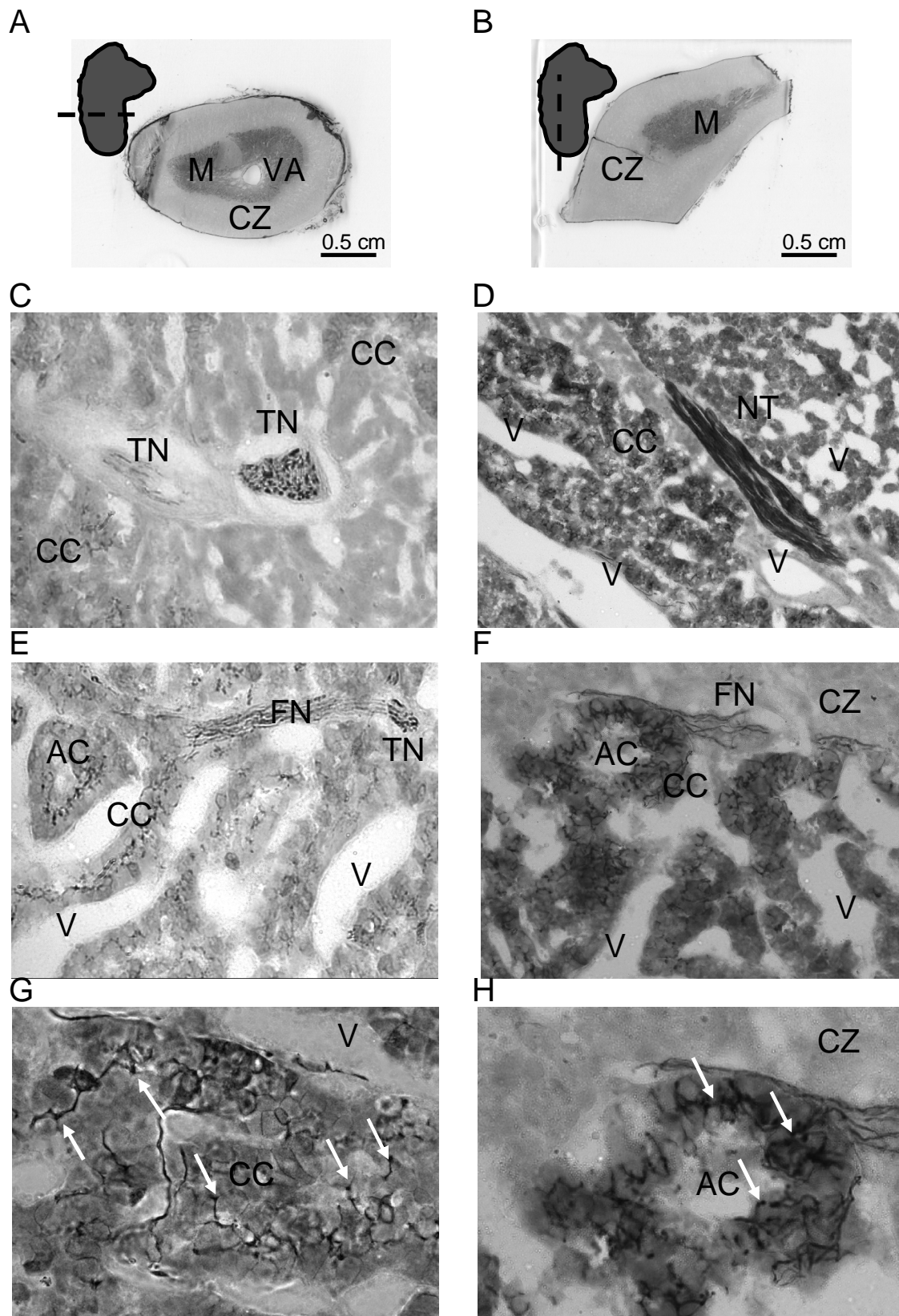


Figura 11. Inervación colinérgica de la glándula adrenal demostrada por tinción de la acetilcolinesterasa. En los paneles A y B aparecen los cortes enteros acompañados de una silueta de una glándula adrenal indicando la zona donde se realizó el corte con una línea discontinua. La sección longitudinal se cortó ligeramente descentrada a propósito para evitar el gran vaso central y obtener así una mayor porción de médula. En los paneles C y D se muestra la médula a bajo aumento. Destacan tractos

nerviosos que se tiñen intensamente indicando la presencia de grandes cantidades de ACE. En la sección transversal se pueden observar numerosos de estos tractos nerviosos como el del panel C situados en la zona central cerca de los vasos más grandes. En la sección longitudinal, los tractos nerviosos aparecen cortados a lo largo (panel D). Con un aumento intermedio (paneles E y F) se observan numerosas fibras colinérgicas que viajan a través de las células cromafines invirtiéndolas. Es interesante destacar en el panel E la salida de un gran número de fibras colinérgicas de un tracto nervioso cortado transversalmente (esquina superior derecha) y que van a inervar gran cantidad de células cromafines. En los paneles G y H se observa a mayor aumento las varicosidades sinápticas en forma de botones que inervan las células cromafines. AC: acino; CC: células cromafines; CZ: corteza; FN: fibras nerviosas; M: médula; TN: tracto nervioso; V: vaso; VA: vena adrenal.

1.5. Inmunofluorescencia de células cromafines en cultivo

Los experimentos que se presentan en los siguientes capítulos de Resultados han sido realizados en células cromafines bovinas en cultivo. Por esta razón es de interés conocer las características de nuestro cultivo.

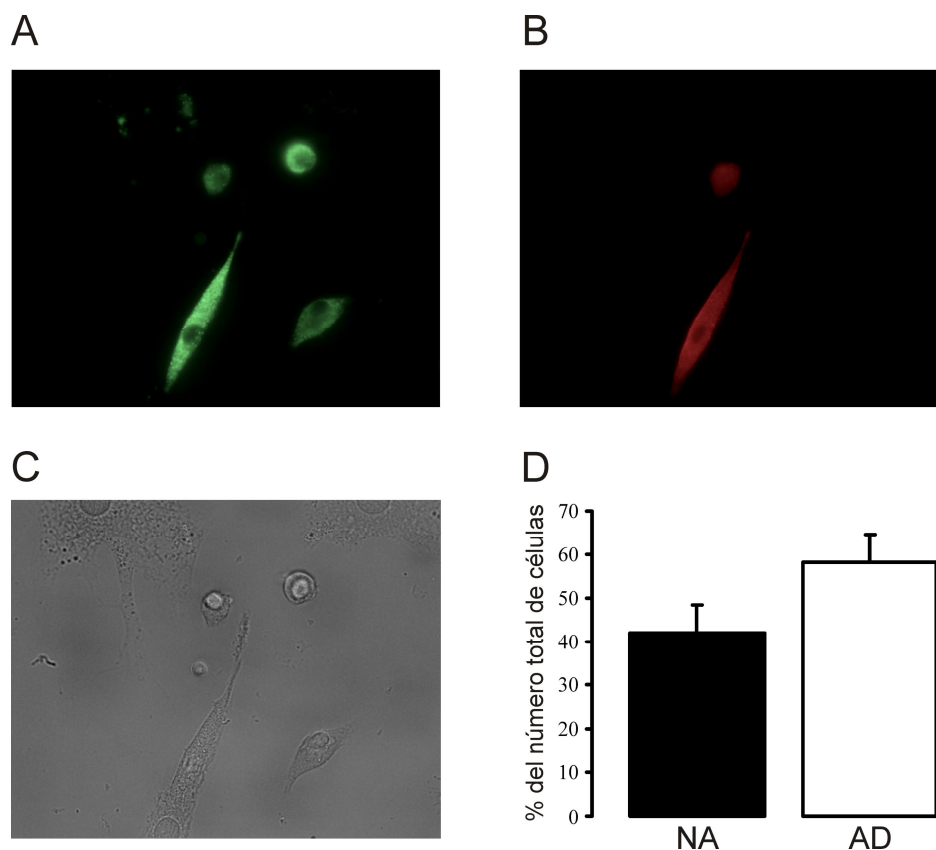


Figura 12. Células adrenocromafines bovinas adrenérgicas y noradrenérgicas en cultivo. Se hizo una inmuno doble con anticuerpos frente a las enzimas DBH (identificada con un secundario conjugado con fluoróforo verde, panel A) y PNMT (fluoróforo rojo, panel B). En las imágenes se muestran cuatro células cromafines, dos de las cuales son adrenérgicas (tienen ambas enzimas) mientras que las otras 2 son noradrenérgicas pues sólo se marcan con DBH. Hay una célula adrenérgica que emite prolongaciones y una noradrenérgica que comienza a emitirlas (flechas blancas). En el panel C se muestra la imagen en campo claro. El diagrama de barras del panel D muestra el porcentaje de uno y otro tipo (n=3 cultivos).

Se hicieron inmunofluorescencias con anticuerpos frente a la DBH y la PNMT lo que permitió cuantificar el porcentaje de células adrenérgicas (AD) y noradrenérgicas (NA) presentes en los cultivos. Las células llevaban 24 h de cultivo. La mayoría de células tienen un aspecto redondeado; algunas emiten prolongaciones (Fig. 12). Para cuantificar el porcentaje de uno y otro tipo de células, se recorrió el cubre de células tomando microfotografías de fluorescencia. Se empleó un microscopio Nikon con un objetivo de inmersión 60X con un sistema de fluorescencia convencional. Se contaron entre 90 y 140 células por cultivo, y se calculó el porcentaje de células NA (aquellas que sólo emitían fluorescencia verde) y el de AD (que emitían fluorescencia verde y roja). Los resultados mostraron un porcentaje similar de ambos tipos de células. Un $41.9 \pm 6.4 \%$ de las células eran NA y $58.1 \pm 6.4 \%$ AD.

2.- Excitabilidad de la célula cromafín bovina

2.1. Potencial de reposo y actividad espontánea en la célula cromafín bovina

Se midió el potencial de reposo y la actividad espontánea de 91 células cromafines bovinas de 17 cultivos distintos. Se empleó para ello la técnica de patch-clamp en modo de parche perforado y en configuración de fijación de corriente. La célula se selló en fijación de voltaje y se mantuvo en ese modo hasta que la anfotericina-B ejerció su efecto permeabilizador y la resistencia en serie bajó por debajo de $30 \text{ M}\Omega$ en aproximadamente un tercio de las células y de $20 \text{ M}\Omega$ en el resto. No se encontraron diferencias significativas en los promedios de ambos grupos por lo que se calculó la media de todas juntas cuyo valor fue de $51,9 \pm 1,4 \text{ mV}$.

En 44 células (cuya resistencia en serie era menor de $20 \text{ M}\Omega$) se registraron las oscilaciones espontáneas del potencial de membrana durante 30 s a 1 min nada más activar la fijación de corriente y establecer una inyección de corriente nula. Alrededor de un 35% (15 de 44) emitieron potenciales de acción con una frecuencia de aparición irregular: a veces disparaban pequeñas ráfagas de 3 ó 4 y otras emitían potenciales de acción sueltos de vez en cuando (Fig. 13).

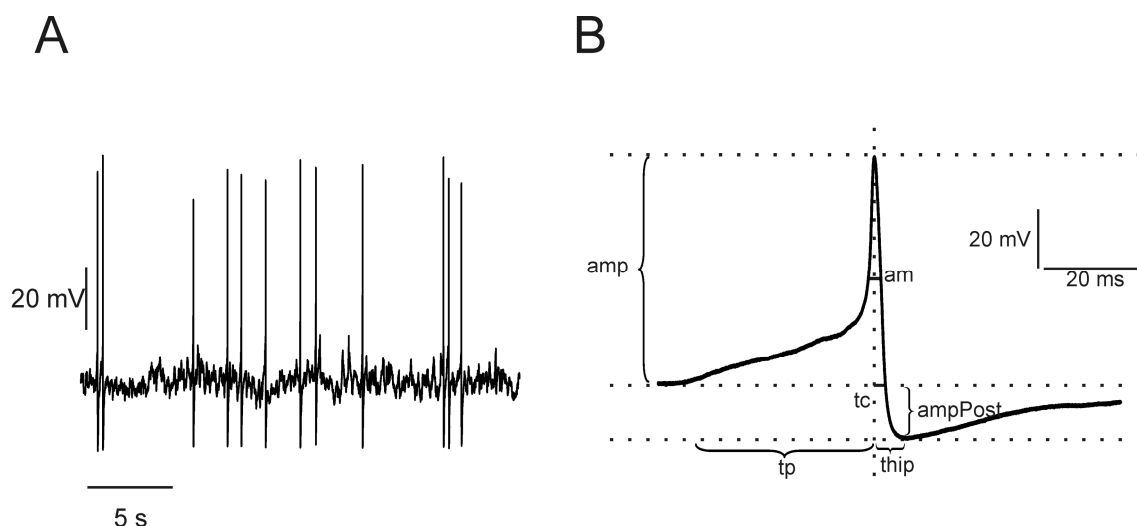


Figura 13. Potenciales de acción espontáneos y parámetros cinéticos. El panel A ilustra un registro original de una célula cromafín bovina que emite PA espontáneos en fijación de corriente. Uno de estos PA se muestra a escala extendida en el panel B, donde se indican los parámetros cinéticos analizados: amp: amplitud (mV), desde que comienza la despolarización hasta el pico máximo del PA; am (ms): anchura media (ms), la anchura de la espiga en la mitad de la amplitud máxima; ampPost: amplitud de la fase de posthiperpolarización (pA), desde que se alcanza la basal tras el PA hasta la hiperpolarización máxima; tc: tiempo de caída (ms), desde el pico hasta que se alcanza la basal inicial; thip: tiempo posthiperpolarización (ms), el tiempo que se tarda en alcanzar la máxima posthiperpolarización; tp: tiempo al pico (ms); tiempo en alcanzar la amplitud máxima desde el inicio de la despolarización.

Se hizo un análisis cinético de los potenciales de acción espontáneos con el objetivo de tener una caracterización de los mismos, para poder compararlos con los potenciales evocados por distintos procedimientos que se detallarán en secciones posteriores. Los parámetros medidos se indican en la figura 13B, y los valores obtenidos en la tabla 1. Puesto que el número de PA emitidos por cada célula era muy variable, se decidió hacer un promedio de los parámetros de todos los PA de cada célula. Por lo tanto, para el cálculo de los estadísticos finales se utilizó un valor de cada parámetro por célula. De esta forma se evita darle más peso a los datos de las células que emitieron más PA. Este método se ha sugerido para el análisis de espigas amperométricas por ser estadísticamente más robusto (Colliver y col., 2001). Se estableció un mínimo de 6 PA para la inclusión en el análisis. Siete células emitieron entre 6 y 30 PA que sirvieron para el análisis presentado en la tabla 1. La amplitud media fue de 65.1 ± 4.4 mV; su anchura media de 2,7 ms y el tiempo en alcanzar el máximo desde el inicio de la despolarización de unos 60 ms. Este tiempo tan largo se debe a que la despolarización inicial hasta alcanzar el umbral de disparo era lenta.

2.2. Efectos despolarizantes de altas concentraciones de K^+ extracelular; concordancia con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)

La membrana de la célula cromafín y de las células excitables en general es permeable a los iones K^+ en reposo. La distribución asimétrica de este ión en el interior y en el exterior de la célula produce una diferencia de potencial que cambia si se modifican la concentración de K^+ extracelular. En la figura 14A se muestra un experimento en el que se han ido profundiando soluciones con concentraciones crecientes de K^+ (equilibrado osmóticamente retirando cantidades similares de Na^+) a una célula cromafín bovina en fijación de corriente. A mayores concentraciones, la despolarización es también mayor, como era de esperar pues según la ecuación de Nernst para las distintas concentraciones usadas se debe de observar un cambio en la diferencia de potencial. La célula dispara PA espontáneamente pero al aumentar la concentración de K^+ hasta 15mM el disparo cesa, seguramente debido a la inactivación de los canales de Na^+ .

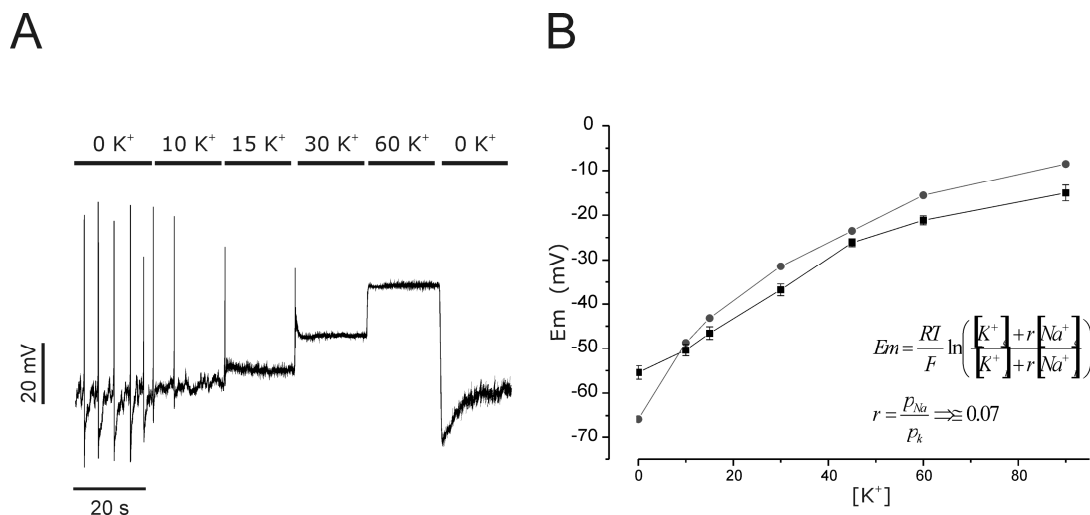


Figura 14. Efectos del cambio de la $[K^+]_e$ sobre el potencial de membrana y ajuste a la ecuación GHK. En el panel A se muestra un registro original de las variaciones del potencial de membrana de una célula cromafín bovina superfundida con las concentraciones de K^+ extracelular (en mM) señaladas sobre las barras de tiempo en la parte superior. El análisis de varios experimentos similares al anterior (NNN) dio como resultado la curva mostrada en el panel B que relaciona E_m con $[K^+]_e$ (cuadrados negros, media \pm e.e.). La ecuación de Goldman para las distintas $[K^+]_e$ produce una curva similar (círculos grises).

En condiciones de reposo, la célula cromafín es mayoritariamente permeable a los iones K^+ pero también deja el paso de una pequeña cantidad de cationes Na^+ . Se ha estimado que la permeabilidad al Na^+ es alrededor de un 7% de la del K^+ (A. R. Artalejo, 1995). Goldman, Hodgkin y Katz propone una ecuación que tiene en cuenta las permeabilidades a estos iones y las concentraciones de los mismos en el interior y

exterior de la célula. Esta ecuación se aproxima con precisión a los potenciales de membrana medidos en condiciones experimentales. En la figura 14B se han representado los promedios de 13 experimentos similares al de la figura 14A (cambiando los órdenes de aplicación de las distintas soluciones) junto con los datos teóricos calculados con la ecuación GHK.

Además de para explorar las propiedades del potencial de membrana, los experimentos con distintas concentraciones de K^+ ilustran muy bien los patrones despolarizantes empleados en numerosos experimentos que contrastan de manera muy llamativa con los que seguramente ocurre “in situ”: frente a la despolarización constante y sostenida del K^+ (Fig. 14A), los cambios de voltaje pulsátiles y rápidos de los potenciales de acción (Fig. 16A).

2.3. Cambios en el potencial de membrana producidos por la superfusión continua de agonistas colinérgicos

Puesto que el neurotransmisor excitador responsable de la secreción de catecolaminas en la médula adrenal es la AC, numerosos trabajos la han empleado para estudiar la secreción de estas neurohormonas. También se ha estudiado el efecto de la estimulación colinérgica sobre la excitabilidad del potencial de membrana de la célula cromafín; Kidokoro y col. (1980) describen un incremento de la frecuencia de disparo a concentraciones crecientes de AC en rodaja de médula adrenal de rata medido con registro extracelular. Sólo el estudio de Fenwick y col (1982) ha medido el efecto de la AC sobre el potencial de membrana y la generación de PA en célula cromafín bovina; la AC estaba en la pipeta de patch en la configuración de célula adherida.

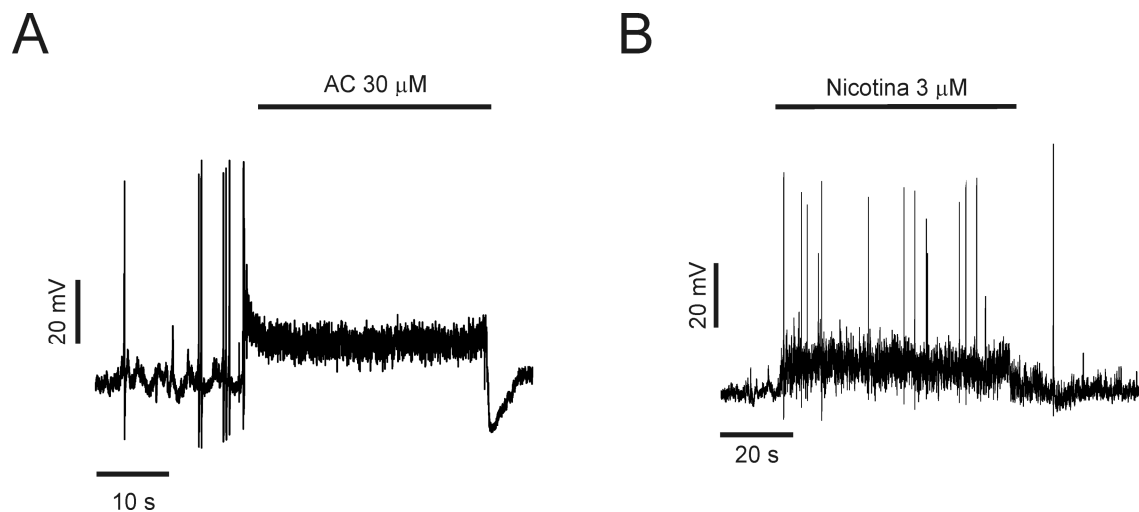


Figura 15. Efecto de la perfusión durante largo tiempo de una agonista colinérgico. Panel A, efecto de la AC 30 μ M sobre el potencial de membrana. Panel B efecto del la nicotina 3 μ M sobre el potencial de membrana.

La perfusión de AC 30 μ M durante 30 s produjo una rápida despolarización acompañada del disparo de algunos PA; a los pocos segundos, la despolarización se estabilizó en una meseta durante el resto del tiempo de la perfusión. En esta meseta, el registro de potencial de membrana muestra unas fluctuaciones más amplias en contraste con el potencial de membrana en condiciones basales, seguramente debido a la apertura y cierre aleatorio de los canales iónicos acoplados al receptor nicotínico. En 8 células la despolarización media en la meseta fue de 15.1 ± 1.50 mV. Cuando se aplicó la solución de lavado, la membrana celular se hiperpolarizó rápidamente. En registros de duración similar, pero realizados en fijación de voltaje, la corriente nicotínica se inactivó en dos fases, una inicial rápida en los primeros 5 segundos y otra muy lenta que alcanzaba los -40 a -50 pA a los 30 s. Esta pequeña corriente seguramente es suficiente para mantener la despolarización en meseta que ocurría en fijación de corriente.

Cuando se perfundió una baja concentración de nicotina, 3 μ M, el registro de potencial de membrana mostraba una ligera despolarización de unos 10 mV, con fluctuaciones más amplias que la basal, de forma parecida a lo que ocurría con la AC. Sobre esta despolarización se disparaban PA, al contrario que con la de AC que era lo suficientemente grande como para impedir el disparo.

2.4. Potenciales de acción evocados de forma controlada por AC

Se perfundió AC a distintas concentraciones durante cortos periodos de tiempo (véase características del sistema de perfusión en Métodos). Se encontró que con la concentración de 30 μ M aplicada durante 25 ms se podía estimular el disparo de un solo potencial de acción a bajas frecuencias (0.3 - 1 Hz) (Fig. 16A). Para comprobar el tipo de corrientes nicotínicas que generan estos estímulos, se aplicó la misma clase de estímulos en la configuración de fijación de voltaje, a un potencial de fijación de -50 mV, similar al de reposo. La corriente registrada (I_{AC}) tuvo una amplitud media de 340 pA (338 ± 31.5 pA) y alcanzó su máximo en unos 24 ms (Fig. 16B).

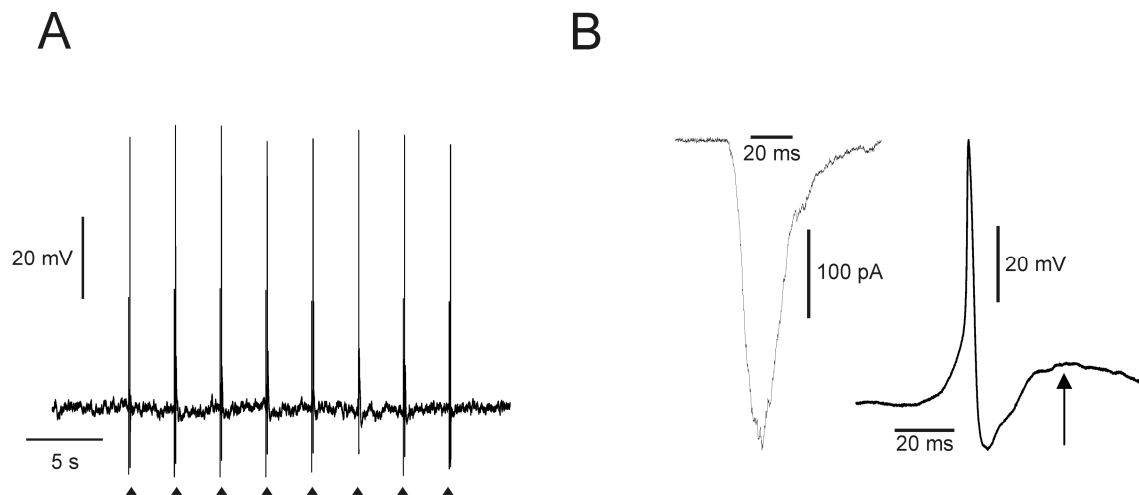


Figura 16. Potenciales de acción y corriente nicotínica evocados por perfusiones ultrarrápidas de AC. Panel A, 10 potenciales de acción producidos por la perfusión durante 25 ms de de AC 30 μ M a 0.3 Hz. En el panel B se muestra uno de estos potenciales a escala ampliada, así como la corriente nicotínica producida en fijación de voltaje por un estímulo de las mismas características.

En una buena parte de los PA se observó una pequeña elevación de la basal tras el disparo (Fig. 16B, flecha). Esto es probablemente debido a las limitaciones del sistema de perfusión utilizado que tardaba unos 80 ms en lavar completamente el agonista (véase características en métodos).

Se analizó la cinética de los PA generados por estos protocolos. De los 256 PA registrados en 8 células sólo el 52% mostraron una post-hiperpolarización clara; en el resto quedaba oculta por la despolarización posterior al PA. El análisis cinético se hizo por tanto en ese 52% de PA “completos”. La amplitud media fue de 76 mV y tardaron una media de 38 ms en alcanzar el pico (tabla 2). A pesar de ser evidente, la posthiperpolarización fue significativamente menor que la de los PA espontáneos, probablemente debido a que todavía quedaban restos de AC en el medio.

Tabla 2. Características de los PA espontáneos y evocados por diferentes estímulos

	Amplitud (pA)	Tiempo al pico (ms)	Anchura media (ms)	Tiempo de caída (ms)	Amplitud posthiperpola- rización (pA)	Amplitud posthiperpola- rización (ms)	Constante de tiempo de recuperación (ms)
Espontáneos (7, 98)	63.7 ± 3.7	57.1±11.8	2.7±0.4	2.7±0.4 ^{##}	19.7±1.5 [#]	4.6±0.7	32.7±7.9
AC (7, 151)	76.3± 4.2	38.0 ± 8.2	2.8 ±0.2	4.1 ± 0.4	12.3±1.2	3.9±0.5	-
Eléctricos (6, 280)	69.0±3.6	* 13.3±1.1 [#]	2.7±0.2	2.4±0.2 ^{##}	19.5±2.2	4.2±0.2	24.0±4

Entre paréntesis se indican el número de células y el número de PAs analizados. Los parámetros cinéticos se describen en la sección de PAs espontáneos. La AC interfirió en la recuperación desde la posthiperpolarización hasta el potencial de reposo (véase texto), por ello la constante de tiempo de recuperación no se da para este grupo. * $p < 0.05$ con respecto a PAs espontáneos; $\#p < 0.05$, $##p < 0.001$ con respecto a los potenciales evocados por AC. ANOVA excepto para el tiempo al pico y la constante de tiempo de recuperación que no cumplieron los criterios para la aplicación de un test paramétrico; se empleó el test de ANOVA por rangos en este caso.

2.5. Potenciales evocados de forma controlada por aplicación repetida de estímulos eléctricos similares a las corrientes de AC

En la sección anterior describimos la cinética de la I_{AC} generada por la perfusión rápida de AC y las limitaciones en la velocidad del sistema de aplicación. Tomando como patrón las corrientes generadas por la AC y las corrientes postsinápticas excitadoras registradas en rodajas de médula adrenal de rata (Barbara y Takeda, 1996, Kajiwarra y col., 1997) se elaboraron, por medio de rampas de corriente, protocolos que emulaban las I_{AC} , que se aplicaron en fijación de corriente con el objetivo de inducir el disparo de PA.

Aunque la corriente de 300 pA resultado de la perfusión de 30 μ M de AC producía PA con alta fiabilidad, se razonó que probablemente una corriente mucho menor sería suficiente para alcanzar el umbral de disparo. Aun así se probó a evocar PA con una inyección de corriente similar a la corriente nicotínica producida por la perfusión de AC 30 μ M pero algo más rápida, dado que se habían descrito corrientes postsinápticas excitadoras (CPE), evocadas por una fuerte estimulación eléctrica, de este tamaño e incluso mayores, en célula cromafín en rodaja de glándula adrenal de rata (Barbara y Takeda, 1996, Kajiwarra y col., 1997). El protocolo estaba compuesto por tres rampas de corriente: Una de 10 ms desde 0 a 300 pA, otra de 300 a 100 pA en 5 ms y otra hasta 0 pA en 3 ms. Este protocolo aplicado a 1 Hz siempre produjo PA. Sin embargo, el cambio de potencial producido en la fase despolarizante se superponía en el tiempo al del estímulo lo que indicaba que era el resultado tanto de la corriente de Na^+ de la célula como de la inyección de corriente (Fig. 17A); además tras la apertura de los canales de K^+ , cuya corriente devuelve rápidamente el Em a la basal, hay una pequeña despolarización final, parecida a la que produce la AC residual (véase epígrafe anterior) debido a que todavía se sigue inyectando corriente. Para intentar eliminar esa despolarización final, se redujo el tiempo de estimulación, generando el siguiente protocolo: de 0 a 300 pA en 4 ms, de 300 a 100 en 5 ms, y finalmente de 100 a 0 en 3 ms. Estos tiempos son muy similares a las corrientes postsinápticas registradas en célula cromafín de rodaja de adrenal de rata (Barbara y Takeda, 1996). Produjeron PA rápidos de cinética similar a la corriente inyectada (Fig. 17B). El PA era de mayor amplitud probablemente debido a que las corrientes inyectadas y las debidas a la apertura de los canales voltaje-dependientes se combinaron.

El tamaño cuantál medido como una corriente excitadora postsináptica en la célula cromafín de rata es de unos 20-30 pA, el tiempo al pico de unos 2-3 ms y la vuelta a la basal de unos 10 ms (Barbara y Takeda, 1996). Para comprobar si con una

CPE de estas características se podía producir un PA en la célula cromafín bovina, se elaboró el siguiente patrón de inyección de corriente: inyección en una rampa de 3 ms desde el 0 pA hasta 30 pA; desde 30 pA hasta 10 pA en otra rampa que duraba 5 ms; finalmente otra rampa de ms volvía a 0 pA en 4 ms (Fig. 17C). Este protocolo, era suficiente para llevar el potencial de membrana al umbral de disparo de los PA en la mayoría de estímulos. Cuando fue aplicado a 1 Hz produjo el disparo del 93% de los 300 estímulos aplicados a 6 células distintas (Fig. 17D).

Se realizó un análisis cinético de estos PA y se comparó con las características cinéticas de los PA descritos anteriormente (véase tabla 2). Destaca la coincidencia de la anchura media (2,6 – 2,8 ms) encontrada en los PA generados con los tres tipos de estimulación. Se trata de la una respuesta “todo o nada” típica de los PA una vez que el umbral de disparo se ha alcanzado.

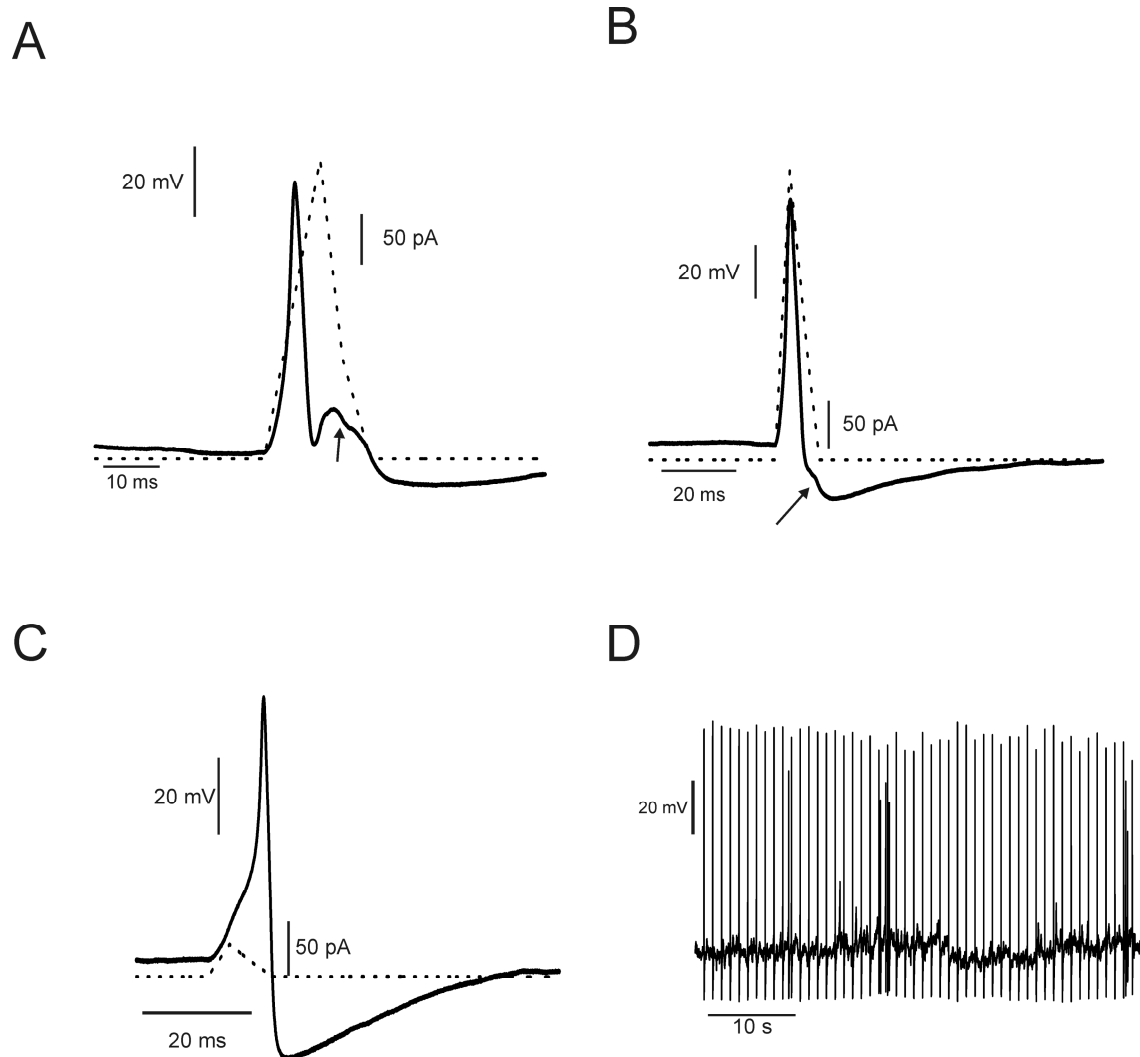


Figura 17. Potenciales evocados por rampas de inyecciones de corriente. Los paneles A, B y C muestran los potenciales evocados (líneas sólidas) por distintos protocolos compuestos de rampas de corriente aplicadas en fijación de corriente (líneas punteadas). Los detalles se pueden encontrar en el texto. El panel D muestra un tren de

50 PA evocados por la aplicación de 50 inyecciones como la de el panel C aplicadas a 1 Hz.

2.6. ¿Qué frecuencias de disparo puede alcanzar la célula cromafín?

Hasta el momento se han expuesto distintas maneras de evocar el disparo de PA a bajas frecuencias. En este epígrafe se intenta definir cuáles son los requisitos necesarios para obtener mayores frecuencias de disparo mediante el empleo de los protocolos elaborados. La primera aproximación que se abordó fue la repetición de la onda de corriente patrón a distintas frecuencias. Con frecuencias de hasta 5 Hz se producía el disparo de PA de forma reproducible. En la figura 18A y B se puede observar un registro original de un tren de 50 PA evocado a frecuencias de 3 Hz y 5 Hz. Cuando las frecuencias de disparo eran mayores, muchos de los estímulos no dispararon PA (véase figura 18C, a una frecuencia de 10 Hz). Esto era curioso pues la duración total de un patrón de inyección de corriente era de unos 12 ms y la del PA generado de 20 o 30 ms, es decir que frecuencias de entre 30 y 50 Hz eran teóricamente posibles. Sin embargo parece que el periodo refractario de la membrana de la célula cromafín (recuérdese que la constante de tiempo de retorno al potencial de reposo después de la posthiperpolarización tras un potencial evocado era de alrededor de 24 ms, véase Tabla 2) evitaba que el estímulo patrón, con un pico de corriente de 30 pA, produjera PA con alta eficacia a frecuencias mayores de 5-10 Hz.

Para alcanzar frecuencias de disparo más altas, debía aplicarse un estímulo más intenso que llevara al potencial de membrana al umbral de disparo cuando aun estaba recuperándose de la fase de posthiperpolarización. Se decidió incrementar la amplitud máxima en múltiplos de 30 pA, que era la corriente elemental máxima seleccionada, y mantener el curso temporal de la onda igual. Estos aumentos son un escenario fisiológico factible dado que la célula cromafín puede estar inervada por varias terminaciones espláncnicas: un incremento de la frecuencia de disparo del espláncnico puede provocar un aumento en el número de vesículas liberadas o bien la liberación simultánea de vesículas en varias sinapsis puede contribuir a una mayor I_{AC} . Aumentos del pico de corriente de hasta 60 pA mejoraron en efecto la eficacia en la generación de PA hasta los niveles de las bajas frecuencias. Se probaron intensidades de hasta 300 pA, sin embargo, con estímulos tan fuertes, el cambio en el potencial de membrana era muy rápido y seguía el curso temporal del estímulo despolarizante, por lo que no se podían distinguir los cambios propios del PA de los producidos por la corriente despolarizante (véase figura 17A, B).

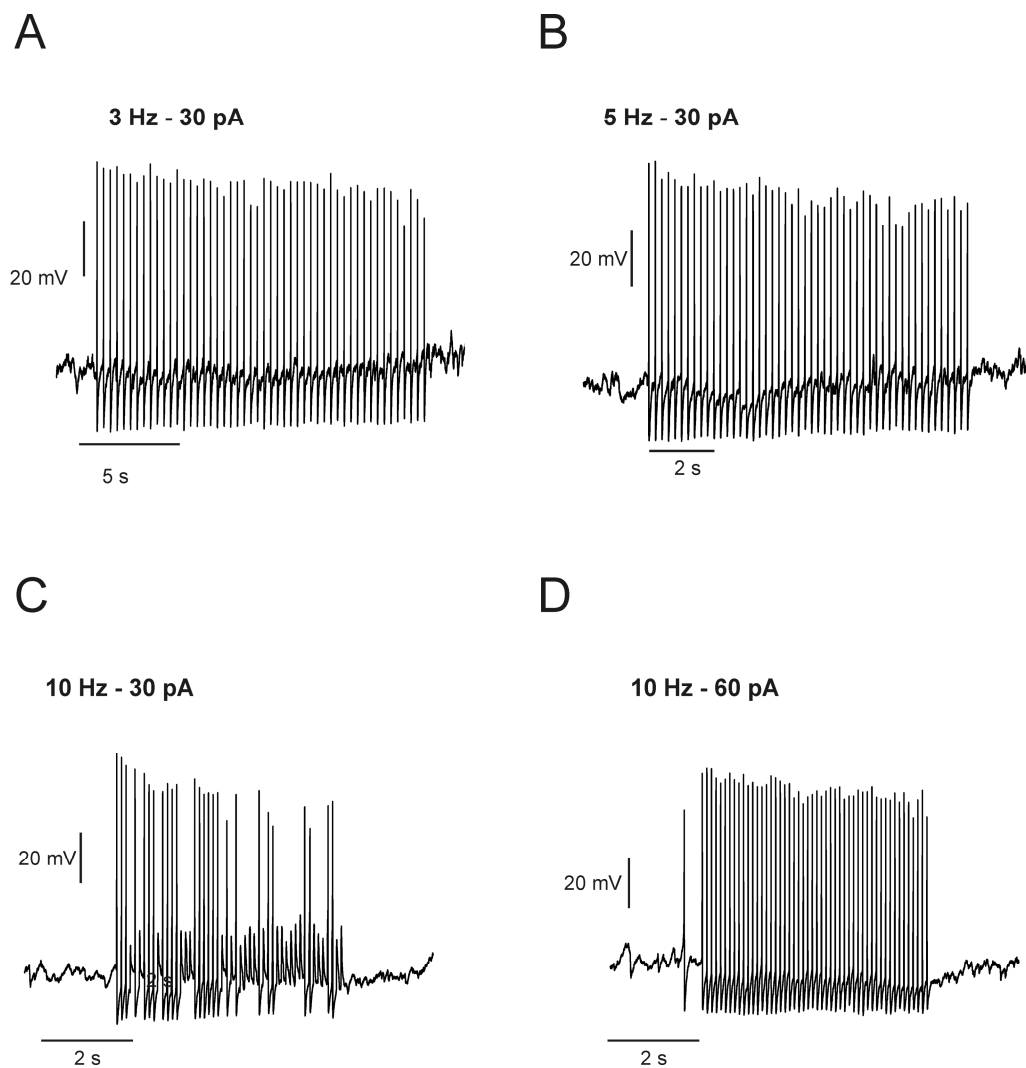


Figura 18. Trenes de PA evocados por trenes de patrones de inyección de corriente. Se aplicaron 50 patrones de inyección de corriente como la descrita en el epígrafe 2.5 (Fig. 17C) a distintas frecuencias. Estos patrones produjeron el disparo de PA con alta probabilidad a frecuencias menores de 5 Hz. Véanse ejemplos de 3 y 5 Hz en los paneles A y B. En el panel C se muestra como a 10 Hz muchos de los patrones no producían PA. Si se incrementaba el pico de corriente inyectada, entonces se recuperaba de nuevo la capacidad de producir PA a mayores frecuencias como muestra el panel D, cuyo primer PA es espontáneo.

Se aplicaron trenes de 50 PA a varias frecuencias a células cromafines de 4 cultivos distintos. En 6 células en que el pico de corriente se mantuvo en 30 pA, los estímulos a 5 Hz produjeron el disparo de un promedio de 32 ± 6 PA, mientras que si se aumentaba el pico a 60 pA se producía el disparo de prácticamente todos los PA del tren (48 ± 1). En 5 células estimuladas a 10 Hz, sólo se dispararon 20 PA de 50 (22 ± 6); si se aumentaba el pico de corriente de 30 a 60 pA de nuevo la eficacia fue casi total (48 ± 2 PA de 50 posibles). A 20 Hz de frecuencia de disparo muy pocos de los estímulos de

baja intensidad produjeron el disparo de PA; en 7 células en las que se incrementó el pico de corriente a 60 pA, funcionaron un promedio de 40 ± 4 estímulos.

Los cuanta de AC podrían no superponerse perfectamente en el tiempo. Probablemente también se liberen con algún desfase temporal entre varios de ellos. Para emular esta situación decidimos superponer 10 de las ondas de corriente elementales con un desfase progresivo de 1 a 12 ms. De esta forma con el desfase de 1 ms, un estímulo comenzaría 1 ms después de haber comenzado el anterior, con 2 ms, comenzaría 2 ms después y así sucesivamente. Con un desfase 0 tenemos una superposición total y una onda de amplitud 10 veces mayor y de duración igual, 12 ms. Con un desfase 12 tendremos 10 ondas contiguas con una duración total del estímulo de 120 ms. En la figura 19A y B se representa el protocolo de 2 ms de desfase y el de 7 ms con las respuestas de una de las células. Con ninguno de estos protocolos se consiguió producir más de 4 PA. De 5 células (2 cultivos) 2 de ellas sólo produjeron 1 o 2 PA con independencia del protocolo aplicado. De las que produjeron un número variable de PA, con desfases entre 0 y 6 ms dispararon 1-2 PA; 2-3 PA con desfases de 6-11 ms y 3-4 PA con desfase de 11-12 ms. La frecuencia de disparo máxima alcanzada con estos protocolos sería de unos 30-35 Hz.

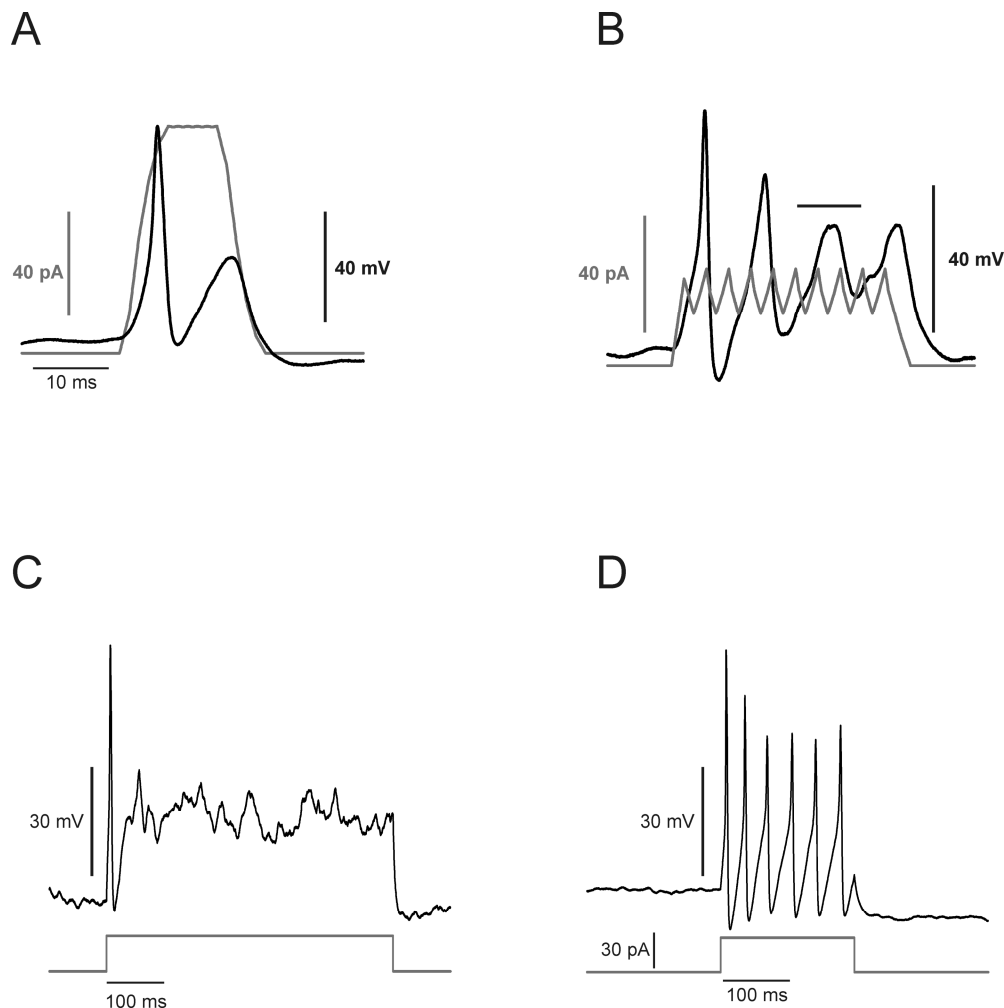


Figura 19. PA evocados por patrones de corriente superpuestos o inyecciones constantes de corriente. En el panel A se muestra el protocolo resultante de la superposición de 10 patrones de inyección de corriente con un desfase de 2 ms (gris) y el cambio de Em producido por la misma (negro). Panel B, igual que el A pero el desfase es de 7 ms. Los paneles C y D muestran la respuesta típica de una inyección de corriente constante (C) y otra menos probable pero que también ocurre (D).

También se intentó conseguir mayores frecuencias de disparo mediante la inyección de una corriente despolarizante constante. Este es un método que ha sido empleado a menudo para evocar potenciales de acción, aunque carece de la posibilidad de controlar la frecuencia de emisión. Se ha utilizado en neuronas (Cassell y col., 1986, McLachlan y Meckler, 1989, Xu y Adams, 1992, Cooper y Stanford, 2000, Jobling y Lim, 2008) y también en células cromafines (Fenwick y col., 1982b, Holman y col., 1994, Kajiwara y col., 1997). En la célula cromafín bovina sólo se ha empleado este tipo de estimulación en el estudio de Fenwick y colaboradores (1982a). Se aplicaron inyecciones de corriente constantes de varios cientos de ms de duración a 10 células de 4 cultivos. La mayoría de células probadas respondieron disparando uno o unos pocos PA al inicio de la estimulación; el potencial de membrana permaneció entonces en un

estado despolarizado con pequeñas oscilaciones hasta que se retiró la inyección de corriente (Fig. 19C). Despolarizaciones constantes de 30 pA produjeron en 9 de 10 células este comportamiento. Una de las células disparó 6 PA en 200 ms (Fig. 19D), es decir alcanzó un máximo de algo más de 30 Hz de frecuencia de disparo. Quizás 30 pA era una inyección de corriente demasiado intensa que no permitía a la corriente de K^+ devolver la célula a su potencial de reposo; esto impediría que los canales de Na^+ se reactivaran e inhibiría por tanto el disparo de PA. Por ello se probó con inyecciones de corriente más leves. Ni las inyecciones de 5, 10 o 20 pA ni las más fuertes de 60 o 90 pA produjeron un comportamiento cualitativamente distinto del previamente descrito.

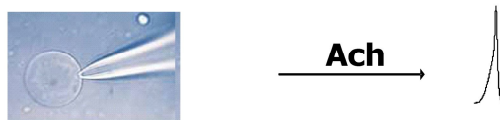
Es interesante señalar la ventaja que supone para el estudio de mecanismos que implican el disparo de PA (como por ejemplo la secreción, o la dinámica del Ca^{2+}), la posibilidad de producir el disparo a frecuencias totalmente controladas por el experimentador con los métodos descritos.

3.- Secreción evocada por potenciales de acción en la célula cromafín bovina

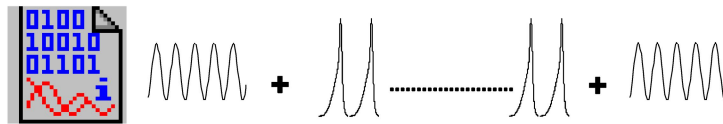
3.1. Elaboración de los protocolos de potenciales de acción

Se elaboraron protocolos consistentes en trenes de potenciales de acción aplicados en fijación de voltaje que permitieron medir las corrientes de Ca^{2+} y las variaciones en la capacidad de la membrana. Para ello se escogió uno de los potenciales de acción generados por la perfusión rápida de AC registrados en la configuración de fijación de corriente. Este potencial de acción patrón se utilizó para generar protocolos de trenes de potenciales de acción que leía el amplificador y aplicaba como estímulo a la célula.

1. Registro de potenciales de acción producidos por AC en fijación de corriente



2. Generación del protocolo con Igor Pro



3. Estimulo y registro con el protocolo generado en fijación de voltaje

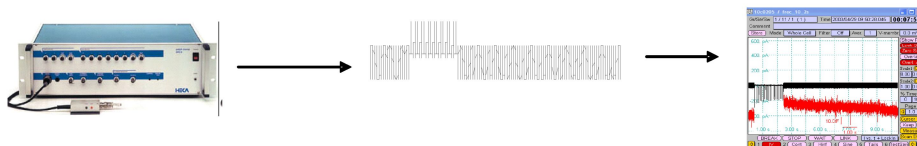


Figura 20. Esquema del proceso de generación de protocolos de trenes de potenciales de acción.

Los datos temporales y de voltaje del PA modelo se almacenan en un fichero de ordenador. Se escribió una macro, dentro del entorno de programación Igor Pro, que leía el fichero patrón y creaba uno nuevo repitiéndolo un número de veces indicado a la frecuencia deseada. Además se añadió una al principio y al final, y en algunos protocolos entre cada dos potenciales, una sección con una onda sinusoidal de voltaje; la respuesta de corriente ante esta onda permitía calcular las variaciones de la capacidad de la membrana, proporcionales a su superficie y por tanto a la exo-endocitosis producida. La técnica de medida de la capacidad de la membrana tiene la limitación de que no puede ser empleada cuando hay cambios importantes en la permeabilidad de la membrana, por lo tanto no se puede medir durante el tiempo de aplicación de los PA u otros estímulos despolarizantes que abren canales iónicos dependientes de voltaje. El fichero generado se guardaba en un formato binario que el programa PULSE, encargado de controlar el amplificador era capaz de leer, ordenando al amplificador que lo aplicara a la célula en estudio. En la figura 20 se muestra un esquema del proceso.

3.2. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis evocadas por trenes de potenciales de acción y pulsos despolarizantes cuadrados

Para evitar que la corriente de Ca^{2+} quedase enmascarada por la de K^+ , la pipeta de patch contenía Cs^+ , ión que aplicado en la cara interna de la membrana bloquea dichos canales. En la figura 21 se observa el potencial de acción modelo (A) y la corriente que genera (B). El primer pico en una corriente de Na^+ de rápida activación e

inactivación. En seguida un segundo pico de menor amplitud y más lenta inactivación aparece debido a la corriente de Ca^{2+} .

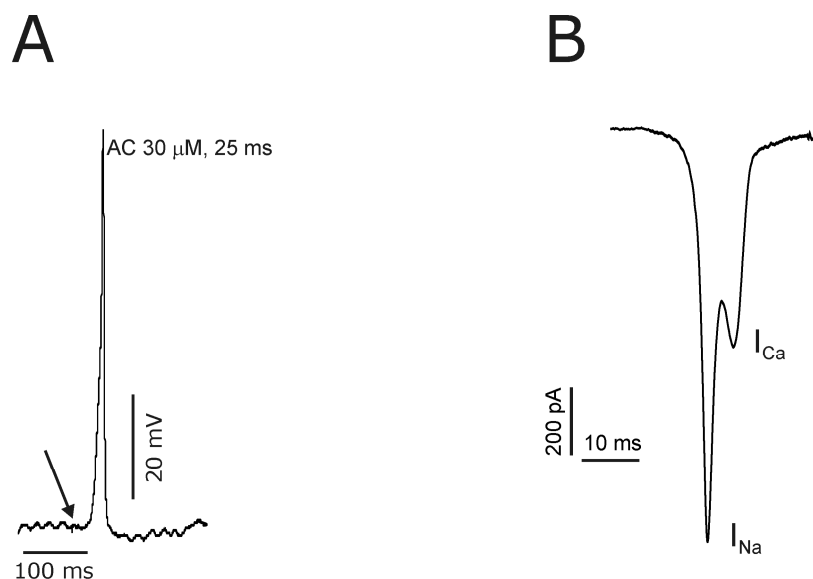


Figura 21. PA modelo obtenido con la perfusión de AC y corrientes de Na^+ y Ca^{2+} que genera. En el panel A aparece un AP generado por la perfusión rápida de 30 μM de AC; la flecha indica el momento de la aplicación de la AC. Cuando este PA se aplica en fijación de voltaje, con los canales de K^+ bloqueados, se observan las corrientes de Na^+ , el primer pico rápidamente inactivante del panel B y de Ca^{2+} , el segundo pico.

Los trenes de PA se aplicaron a una frecuencia de 30 Hz, que como se ha descrito es aproximadamente la mayor frecuencia de disparo que alcanza la célula cromafín bovina en cultivo. Se pretendía así explorar la respuesta exocitótica con una estimulación máxima, pero posible en un ambiente fisiológico, y compararla con una supramáxima, e improbable en términos fisiológicos, como es la despolarización constante de un pulso cuadrado.

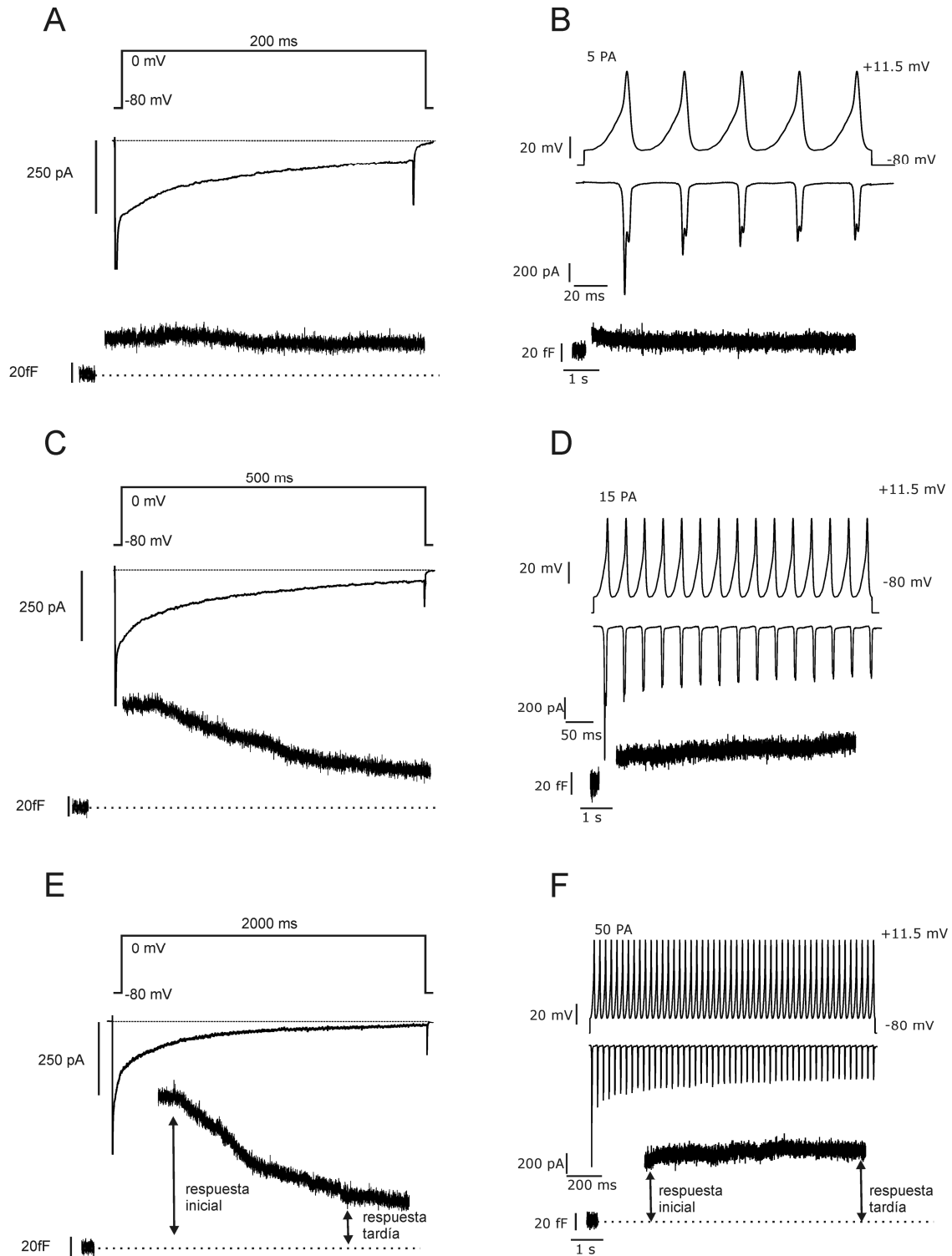


Figura 22. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis producidas por estímulos despolarizantes constantes o por trenes de potenciales de acción. Las células se estimularon con PD de duraciones crecientes desde un potencial de fijación de -80 mV hasta 0 mV (paneles A, C y E). Las corrientes de Na^{+} se han truncado para poder apreciar mejor la I_{Ca} . Las respuestas exo-endocitóticas se midieron con la técnica de capacidad y aparecen debajo de las corrientes. Con una organización similar se muestran las respuestas a los PA (paneles B, D y F).

Además se elaboraron protocolos con pulsos despolarizantes constantes (PD) de aproximadamente la misma duración que los trenes de potenciales de acción y en los

que se medía el “salto” de capacidad después del estímulo. En la figura 22 se representan registros originales de la respuesta a pulsos despolarizantes de 200, 500 y 2000 ms (paneles A, C y E). La corriente de Na^+ se inactiva en los primeros ms del pulso y la corriente que permanece durante el resto del estímulo es debida a la entrada de iones Ca^{2+} (I_{Ca}). Podemos observar que la I_{Ca} también se inactiva paulatinamente a lo largo del pulso; en los últimos ms del pulso más largo apenas quedan unos pocos pA (Fig. 22E). La respuesta exocitótica medida por el salto de capacidad presenta dos características destacables: i) El salto es mayor cuanto más largo es el pulso despolarizante; entra más cantidad de Ca^{2+} y por lo tanto hay una mayor fusión de vesículas y ii) Hay una importante endocitosis, observable en la disminución del trazo de capacidad tras el pulso despolarizante, que también en general tiende a ser mayor y más rápida cuanto mayor es el tiempo de estimulación. Nótese como en el pulso de 200 ms apenas hay descenso en el trazo de capacidad (panel A), mientras que con 500 y 2000 ms el trazo vuelve hasta casi los niveles basales en los 8 segundos de registro post-estímulo (paneles C y E). Para dar cuenta del máximo de exocitosis y endocitosis se calcularon dos parámetros: La respuesta inicial que se obtuvo sustrayendo el pico de máximo de capacidad menos la basal; este máximo ocurría nada más acabar o al poco de terminar el estímulo o a los pocos ms. La respuesta tardía se calculó sustrayendo el valor de capacidad al final del registro de 8 s de la basal.

En la derecha de la figura 22, paneles B, D y F, se representan las respuestas a trenes de potenciales de acción de duraciones parecidas a las de los pulsos despolarizantes cuadrados; Se aplicaron 5 PA (170 ms), 15 PA (510 ms), y 50 PA (1665 ms). A la frecuencia de 30 Hz la corriente de Na^+ no se recupera completamente entre un potencial de acción y el siguiente, y pierde un 40-50% de su amplitud entre el primer potencial y el segundo. El pico de la corriente de Ca^{2+} disminuye rápidamente en los primeros potenciales pero luego se mantiene en unos niveles más o menos estables; este comportamiento contrasta con el de los pulsos despolarizantes cuadrados en los que la corriente se inactiva continuamente durante el tiempo de aplicación del estímulo. El contraste en la respuesta de capacidad es aun más notable. Si con el incremento del tiempo de estimulación se observaba un aumento en la respuesta endocitótica en los estímulos con pulsos despolarizantes cuadrados, en los estímulos con trenes de PA apenas se ven respuestas endocitóticas. Nótese como en ninguno de los ejemplos mostrados en los paneles 22B, D y F ocurre endocitosis tras el pulso. Además, para un mismo tiempo de estimulación la amplitud del salto de capacidad es mucho más modesta que cuando se emplea un PD.

3.3. Separar exocitosis de endocitosis: Registros simultáneos de amperometría y patch-clamp

Las variaciones de la capacidad de la membrana nos proporcionan un indicador tanto de la fusión como de la escisión y retirada de vesículas. En el caso de que estos dos procesos ocurran simultáneamente su interpretación es difícil. Por ejemplo, pudiera ocurrir que en los registros de potenciales de acción, siguiera habiendo exocitosis y endocitosis a un ritmo similar, lo cual apenas sí produciría variaciones en el registro de capacidad (que recordemos que es proporcional a las actividades exocitótica y endocitótica combinadas). Por ello se ha combinado con la técnica de amperometría que sólo mide el proceso de exocitosis por oxidación de las catecolaminas liberadas en la parte exterior de la célula. La utilización conjunta de estas técnicas va a permitir discernir si la exocitosis está sincronizada con la entrada de Ca^{2+} o si continúa tras el cese del estímulo despolarizante.

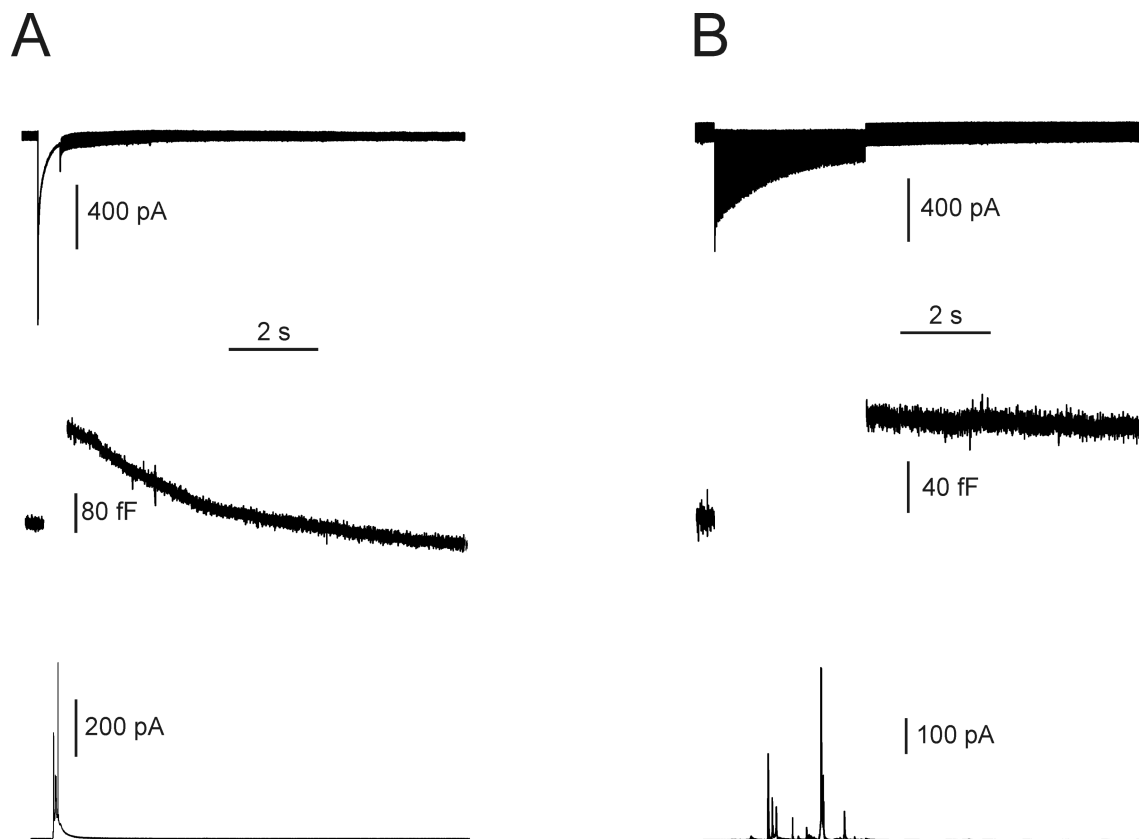


Figura 23. Registros combinados de corrientes, capacidad de membrana y amperometría. En la parte superior se muestran las corrientes, en el medio la capacidad de membrana y en la inferior la respuesta amperométrica producidas por un PD de 500 ms (panel A) y un tren de 100 PA (panel B).

La figura 23A, B muestra un registro típico de esta clase de experimento que nos permite concluir que: i) La secreción ocurre mayoritariamente durante la entrada de

Ca^{2+} , y acaba sobre todo con estímulos fuertes tipo PD, 1 ó 2 segundos después de la terminación del estímulo (ocurrió en 1 de 4 células estimuladas con un PD de 500 ms); ii) en los pulsos despolarizantes cuadrados de larga duración se activa una endocitosis rápida que se mantiene durante varios segundos una vez que ha finalizado la entrada de Ca^{2+} ; iii) esto contrasta llamativamente con la respuesta endocitótica apenas existente cuando se aplican trenes de PA; por lo tanto, de haber una endocitosis rápida, ha de ocurrir durante el tren; es posible que una endocitosis lenta que dure decenas de segundos o minutos se encargue de devolver la superficie de la célula a su tamaño original.

Sabiendo que tras la estimulación, los cambios de capacidad reflejan mayoritariamente un proceso endocitótico, cuantificamos el salto inicial de capacidad, como indicador de la secreción máxima, y la respuesta tardía como indicador de la endocitosis rápida que ocurre durante algunos segundos tras la estimulación (Fig. 22 apartado 3.2 y Fig. 24).

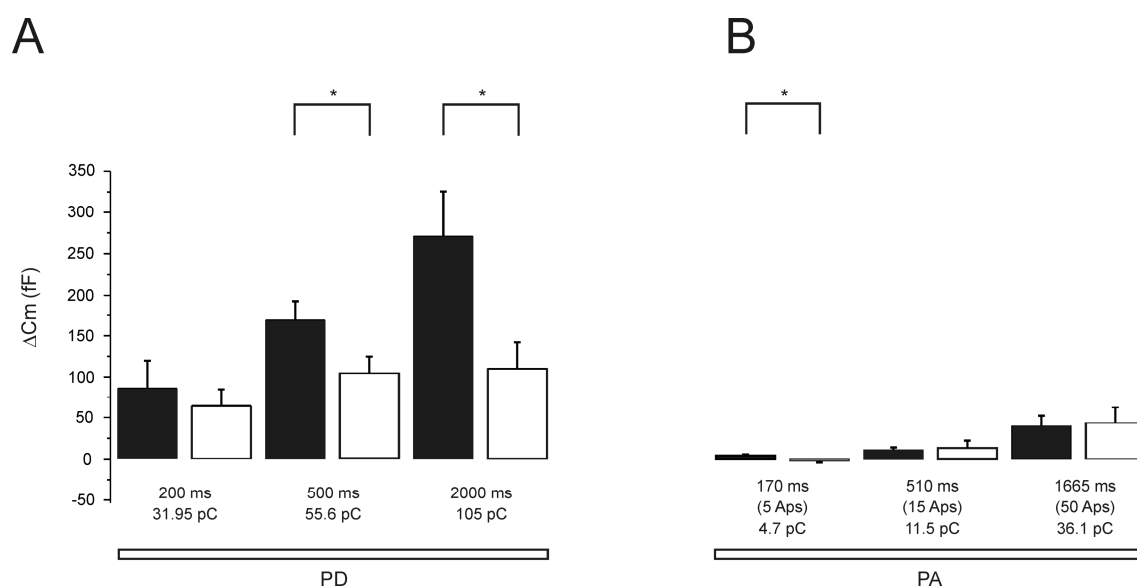


Figura 24. Cuantificación de las respuestas exo-endocitóticas evocadas por PD o PA. El gráfico de barras cuantifica la respuesta inicial (barras negras) medida como la diferencia entre el valor de la máxima de la capacidad justo después del estímulo menos el valor antes del estímulo; también se cuantifica la respuesta tardía (barras blancas), como la diferencia entre el valor de la capacidad en el segundo 7,9 después del estímulo y el valor de la capacidad antes del estímulo. Los valores de PD aparecen en el panel A y los de PA en el panel B. * $p < 0.05$ t de Student.

3.4. Relación entre entrada de Ca^{2+} , variaciones de C_m y duración del estímulo

Además de los estímulos comentados y mostrados en los epígrafes, se aplicaron trenes de PA y PD de otras duraciones a intervalos de 5 minutos a varias células. Así PD de duraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ms se aplicaron a 39

células en órdenes diferentes. En el caso de los PA, trenes de 1, 5, 10, 15, 20, 50 y 100 PA (33, 170, 340, 505, 680, 1685 y 3365 ms de duración) se aplicaron en órdenes distintos a 31 células distintas.

Los protocolos de trenes de potenciales de acción tienen una duración mayor, pero dada su naturaleza pulsátil el tiempo en que el Ca^{2+} está entrando en la célula tiene que ser menor que el tiempo total del estímulo. Para facilitar la comparación entre ambos tipos de estímulos, se estimó el tiempo máximo posible en que el Ca^{2+} entra en la célula durante un potencial de acción modelo. Para ello se realizó una relación corriente-voltaje (I-V) en 6 células cromafines bovinas aplicando pulsos de 20 ms cada 30 s desde un potencial de fijación de -80 mV hasta distintos voltajes obteniéndose la característica curva e forma de V mostrada en la figura 25A que muestra como la corriente de Ca^{2+} comienza a aparecer alrededor de -40 mV. El potencial de acción modelo (Fig. 25B) está durante 9.5 ms por encima de este voltaje, por lo tanto consideraremos éste como el tiempo máximo en que los canales de Ca^{2+} estarán abiertos en cada potencial de acción. De esta manera el tiempo de apertura de los canales de Ca^{2+} de un tren de 100 PA sería de unos 950 ms.

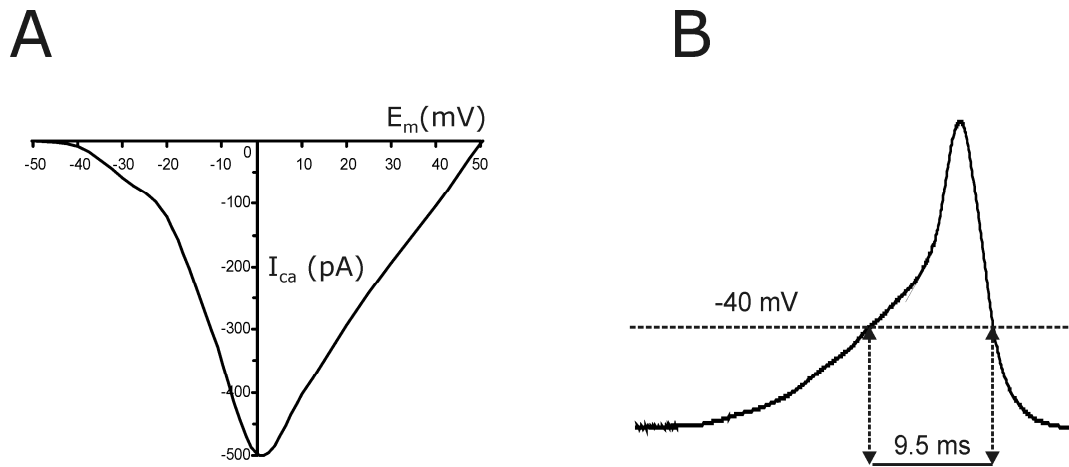


Figura 25. Relación I-V y tiempo máximo de apertura de los canales de Ca^{2+} en un potencial de acción. Panel A, relación corriente-voltaje obtenida con pulsos despolarizantes cuadrados de 20 ms cada 30 s. Panel B, potencial de acción modelo con una línea de puntos señalando el voltaje de -40 mV en que según la I-V comienza la apertura de canales de Ca^{2+} .

En la figura 26 se resume la cuantificación de los resultados obtenidos; se representa la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula (Q_{Ca} , calculada como la integral de la corriente durante el tiempo de estimulación) y el salto de capacidad (ΔCm) frente al tiempo total de estimulación y también frente al tiempo estimado de apertura de canales de Ca^{2+} . Asimismo se representa la relación $\Delta\text{Cm}/Q_{\text{Ca}}$. Para eliminar la contribución de la corriente de Na^+ , en cada célula se repitieron los mismos protocolos en presencia de

100 μM de Cd^{2+} , un bloqueante de amplio espectro de los canales de Ca^{2+} , con lo que se obtenía la corriente de Na^+ pura. La carga de esta corriente de Na^+ se sustraía de la calculada para los registros combinados de corriente de Na^+ y Ca^{2+} , con lo que se conseguía aislar la corriente de Ca^{2+} .

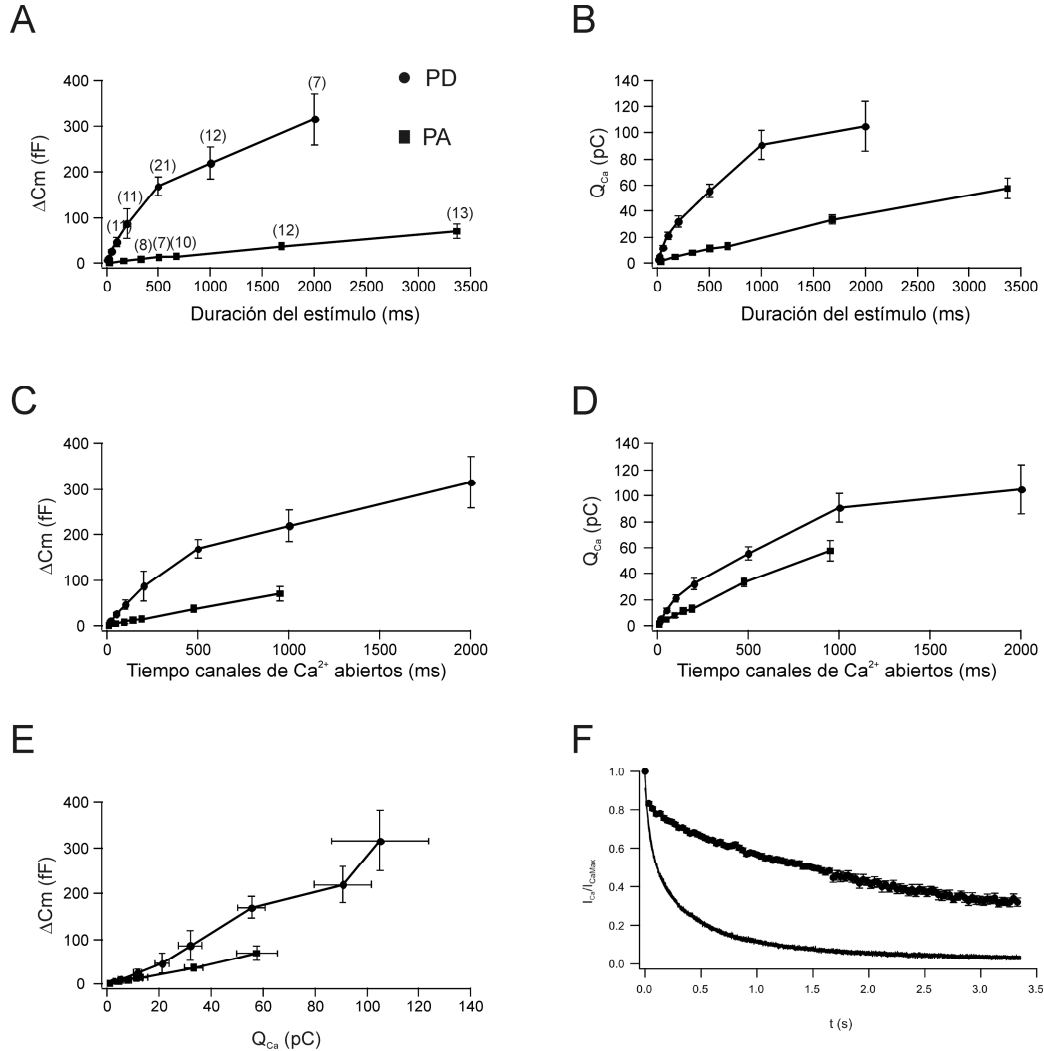


Figura 26. Relaciones entre Q_{Ca} , ΔCm y duración del estímulo. Los paneles A y B representan ΔCm y Q_{Ca} frente al tiempo total de estimulación. ΔCm y Q_{Ca} frente al tiempo de apertura de los canales de Ca^{2+} aparece representado en los paneles C y D. En el panel E se representa la relación $Q_{\text{Ca}} - \text{Cm}$. Para apreciar la diferencial de inactivación de los canales de Ca^{2+} según la estimulación aplicada, se ha representado en el panel F el trazado promedio de 6 células de un PD de 3.3 s, y los picos máximos de corriente de cada uno de los 100 PA de un tren aplicado a 30 Hz en 13 células. Cada punto es la media \pm e.e. del número de células entre paréntesis en el panel A.

La relación entre ΔCm o Q_{Ca} y el tiempo de estimulación o el de apertura de los canales de Ca^{2+} (Fig. 26, paneles A, B, C, D) es lineal cuando el estímulo son trenes de PA (se ajustaron a rectas cuyo coeficiente de determinación, r^2 fue mayor de 0.99). Cuando el estímulo era PD, tanto ΔCm como Q_{Ca} subían muy rápidamente para tiempos de hasta 500 ms - 1 s, pero la pendiente se reducía apreciablemente en tiempos mayores,

quizás debido a la inactivación de los canales de Ca^{2+} y a la activación de una endocitosis rápida.

3.5. Cinética de los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evocados por PA y PD

En los epígrafes anteriores se ha demostrado que los PD y los trenes de PA de similar duración tienen características muy distintas en lo que se refiere tanto a la entrada de Ca^{2+} en la célula como a la secreción evocada. Con los siguientes experimentos se trató de comprobar si estas diferencias se extendían a los transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Para ello se aplicaron trenes de 100 PA y PD de igual duración (3365 ms) a células que habían sido cargadas con la sonda de Ca^{2+} Fluo-4 (Figura 27).

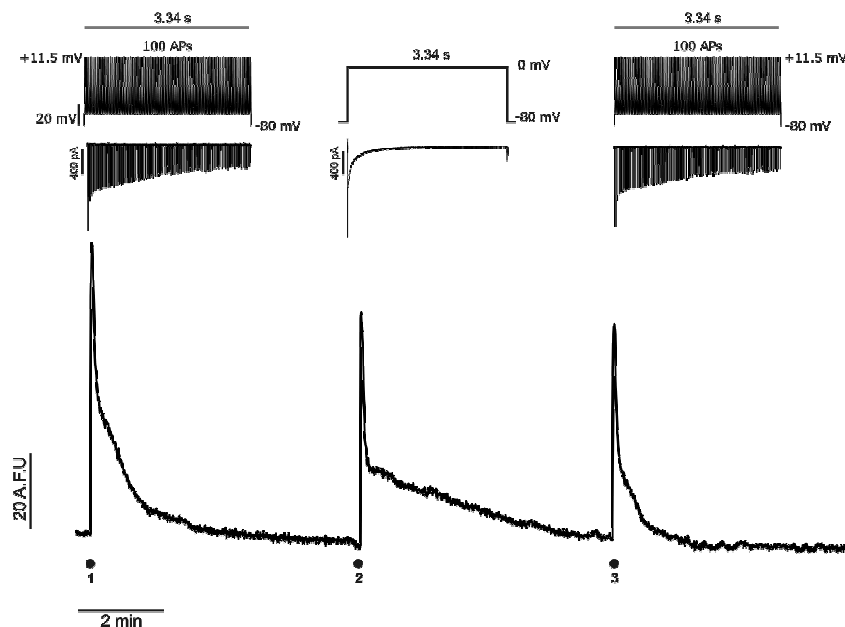


Figura 27. Diferencias en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ entre PD y trenes de PA. La figura muestra un registro original de una célula cargada con Fluo 4 a la que se ha aplicado 2 trenes de 100 PA y un PD de la misma duración separados por 5-6 min. Nótese la diferencia en el tiempo del aclarado de Ca^{2+} tras el estímulo.

Los cambios de fluorescencia se midieron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). En la figura 27 se muestran superpuestos los cambios de fluorescencia debidos a cada uno de estos dos estímulos en dos células distintas. Puesto que el retorno a la basal duraba varios minutos en el caso del PD, se muestran en un panel el ascenso de la señal y el inicio del descenso a una mayor escala temporal (Fig. 27A) y el descenso en otro (Fig. 27B).

Con el PD la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ llegó más rápidamente al pico, y se mantuvo durante más tiempo elevada que con el tren de PA (Fig. 27C y D). El aclarado del $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ocurría en dos fases una rápida cuya constante de tiempo (τ_r) era de alrededor de 1 s con PD y de

más del doble con PA. La constante de tiempo de la fase lenta (τ_l) fue de más de 5 min con los PD y de unos 50 s con los trenes de PA. Esta diferencia puede ser debida a que la masiva afluencia de $[Ca^{2+}]_c$ que se produce con los PD llega a concentraciones en que el uniportador de Ca^{2+} de baja afinidad y alta capacidad de la mitocondria capte ávidamente el Ca^{2+} que se irá liberando lentamente en los posteriores minutos. Al ser la entrada de Ca^{2+} mucho menor con el tren de PA, la mitocondria no jugaría un papel tan importante.

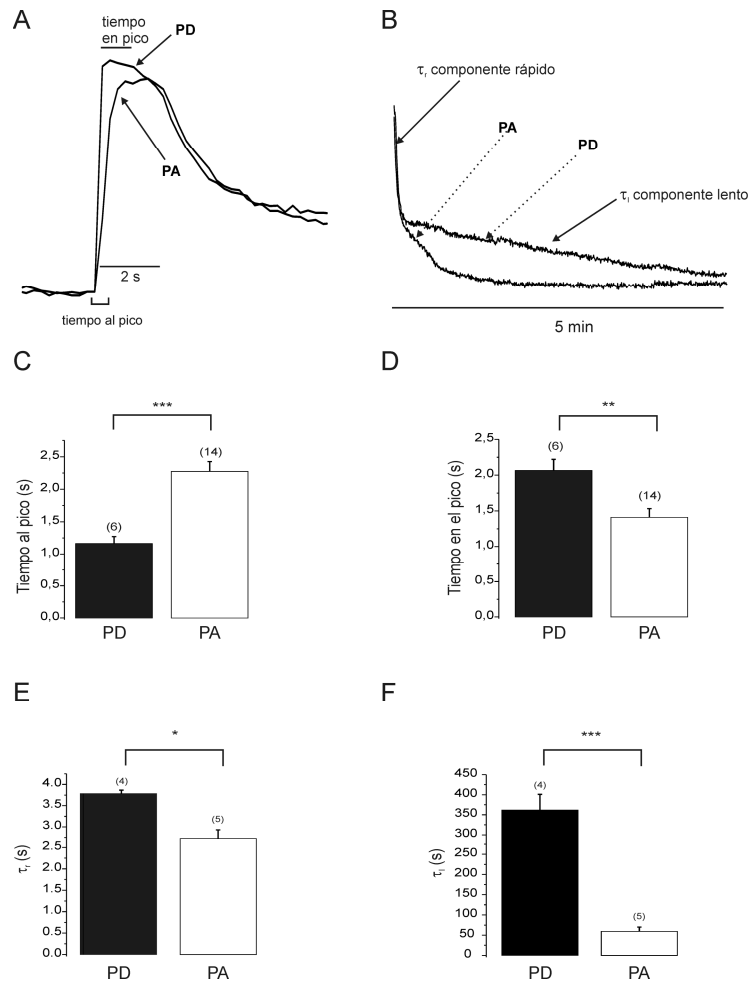


Figura 28. Cinética de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ evocados por PD o PA. Panel A, transientes y aclarado (panel B) de $[Ca^{2+}]_c$ superpuestos de una célula sometida a un PD y otra sometida a un tren de 100 PA (3.36 s, 30 Hz); los parámetros cinéticos calculados fueron el tiempo al pico y el tiempo en el pico (A) y constante de tiempo de caída rápida y lenta (B). Los registros se alargaron durante 10 min después del pulso en una parte de las células medidas, de ahí que el número de células con el que se calculó los parámetros de ascenso y descenso de la $[Ca^{2+}]_c$ sea distinto. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.- Modulación de la excitabilidad, las corrientes de Ca^{2+} y la secreción

4.1. Modulación de la excitabilidad de la célula cromafín por metionina-encefalina

En la Introducción se describió el conocido efecto modulador de los opioides sobre la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) en la célula cromafín. Sin embargo, no se había comprobado previamente cuál podría ser su efecto sobre la excitabilidad de la membrana. Se diseñaron experimentos en los que se evocaba el disparo, a una frecuencia controlada de 1 Hz, de potenciales de acción mediante la aplicación de inyecciones de corriente similares a corrientes excitadoras postsinápticas cuyas características se han descrito en el apartado 2. Cuando se perfundió metionina-encefalina (m.e.) un péptido opioide que se almacena en las vesículas secretoras junto con el neurotransmisor, se produjo una lenta y ligera despolarización, y la amplitud de los potenciales de acción se redujo, así como su posthiperpolarización (Figura 29). Se demuestra así que la m.e. también puede modular la excitabilidad de la membrana.

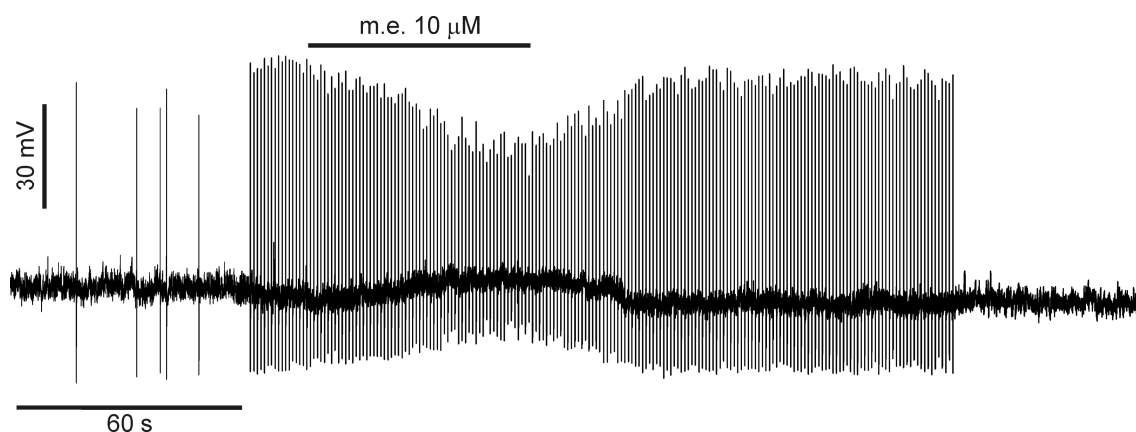


Figura 29. Efecto de la metionina-encefalina sobre el potencial de membrana y el disparo de potenciales de acción. Se registró un periodo basal de 65 s en el que se observa el disparo de algunos PA espontáneos. Entonces se aplicaron patrones de voltaje como las descritas en el apartado 2.5 a una frecuencia de 1 Hz durante 200 s; tras 20 s se comenzó la perfusión de m.e. ($10 \mu\text{M}$) durante 60 s, mientras se mantenían los estímulos de inyección de corriente; luego se lavó durante 120 s; finalmente se registró un periodo sin estimulación eléctrica.

4.2. Modulación de las corrientes de Ca^{2+} y de la secreción evocada por trenes de potenciales de acción

Se ha estudiado en profundidad el efecto de diversas sustancias moduladoras sobre la I_{Ca} (véase Introducción). Algunos trabajos han estudiado también su efecto sobre la secreción (Ulate y col., 2000, Chen y col., 2005). Sin embargo ninguno de estos trabajos ha empleado el patrón de estimulación más fisiológico de trenes de PA.

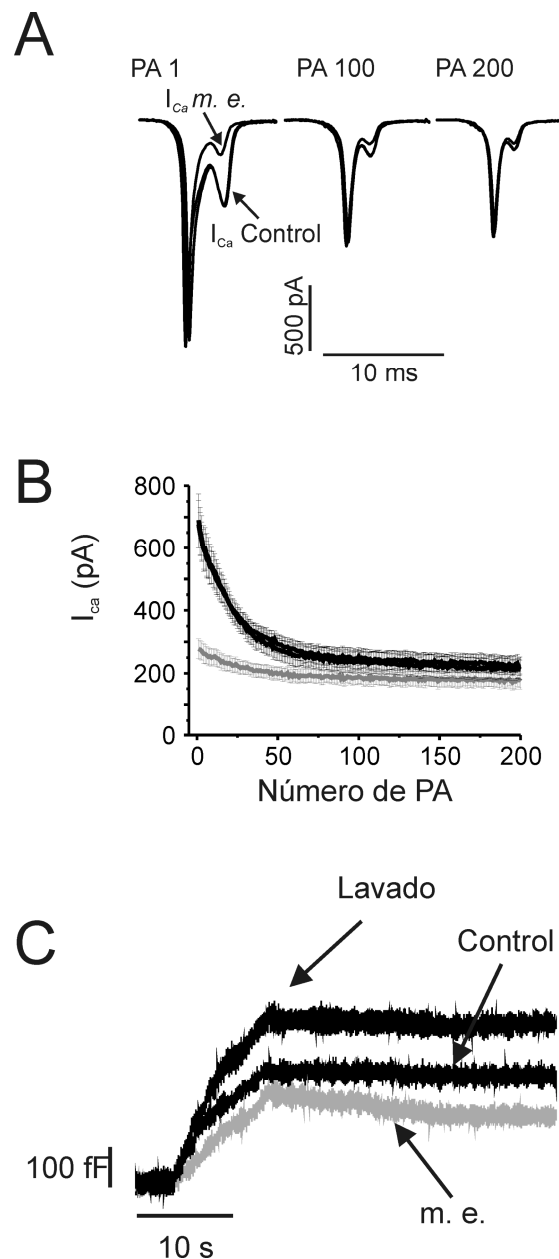


Figura 30. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis producida por un tren de 200 PA. El panel A muestra a escala aumentada las corrientes 1^a, 100^a y 200^a en condiciones control y lavado (superpuestas) y tras la perfusión de m.e. (10 μ M). Los picos de corriente de cada uno de los PA de los trenes aplicados a 8 células se representan en el panel B. En el panel C se muestra la respuesta exocitótica de capacidad.

Se elaboró un protocolo con 200 PA aplicados a la frecuencia de 20 Hz. Esta frecuencia nos permitió introducir una onda sinusoidal de voltaje entre cada 2 PA, lo que sirvió para seguir la evolución de los cambios en la capacidad de la membrana durante el tren de PA a diferencia de los experimentos a 30 Hz presentados anteriormente. La m.e. produjo un importante bloqueo del pico de corriente en los primeros 50 PA, pero posteriormente las corrientes control y moduladas eran similares (Fig. 30A y B). La m. e. también inhibió la respuesta exocitótica, haciéndola más lenta y menor. Cabe señalar que en el pulso de lavado se observó en la mayoría de las células

un incremento de la respuesta exocitótica con respecto a las condiciones control (Fig. 30C).

DISCUSIÓN

1.- Histología general de la glándula adrenal bovina

La glándula adrenal fabrica dos clases de hormonas que ejercen profundos efectos sobre los tejidos del cuerpo: las hormonas adrenocorticales, que son imprescindibles para la vida, y las catecolaminas adrenomedulares, que producen unos cambios rápidos en prácticamente todos los sistemas del organismo preparándolo para una reacción en una situación de alarma. Su importancia funcional se conoce desde principios del S. XX (Britton y Silvette, 1932), lo que ha estimulado el estudio de entre otros aspectos su morfología. Se han hecho estudios histológicos sobre su estructura que han empleado las tinciones más comunes como por ejemplo la hematoxilina-eosina, realizadas sobre varias especies de mamíferos como el caballo, la vaca, el perro, el mono o el hombre y que se pueden encontrar en atlas de de histología veterinaria y humana (Ross y col., 1997, Hullinger y Andrisani, 1998, Bacha y Bacha, 2006). Los marcajes inmunohistoquímicos se han utilizado en la literatura especializada para identificar proteínas de interés; por ejemplo, las enzimas de las rutas biosintéticas de las catecolaminas (TH, DBH, FNMT) se han empleado para identificar células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas sobre todo en cultivo (por ejemplo Núñez y col., 1995, Lomax y col., 1997).

Wrobel & Suss (1999) describen los cambios histológicos en el desarrollo de la glándula adrenal bovina. Algunos trabajos marcan ciertas proteínas en secciones de tejido; por ejemplo Criado y colaboradores (1997) identifican la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico por técnicas de autorradiografía y la enzima FNMT por inmunohistoquímica. Pero en general se dispone de muy poca información sobre la histología de la glándula adrenal bovina. Por ello se realizaron una serie de tinciones para conocer mejor su anatomía celular en un intento de acercarnos a su fisiología.

En la tinción clásica de H&E (Fig. 8) se aprecian claramente las tres capas de la corteza de la glándula y las células de la médula; Es interesante observar como los capilares están estructurados en hileras alargadas en la zona fasciculada de la corteza mientras que en la médula parecen formar marañas más enrevesadas que rodean a los acinos por todos lados. Otro aspecto notable de esta tinción es el color morado que toman no sólo los núcleos sino también los citoplasmas de las células cromafines, seguramente debido al pH ácido de las vesículas que llenan el citosol de la célula cromafín y a la afinidad de la eosina por las estructuras ácidas.

Las células que sintetizan adrenalina expresan la enzima FNMT, las que fabrican otras catecolaminas no lo hacen y se pueden marcar con alguna de las enzimas de la ruta

biosintética de estas monoaminas, como por ejemplo la TH. Las inmunotinciones de la figura 9, marcan estas dos enzimas indicando su presencia exclusiva en la médula de la glándula. Aunque la tinción se observa homogénea a bajo aumento, a gran aumento la intensidad del marcaje de TH varía en las células cromafines de la médula (Fig. 9E, G). Se han realizado estudios de microscopía electrónica que clasifican las células cromafines en 4 tipos que difieren en el número y forma de las vesículas secretoras o en la electrodensidad del citoplasma (Koval y col., 2000). No sería raro por tanto, que esta diversidad se viera también reflejada en la cantidad de expresión de la enzima y por ello en el marcaje. La FNMT muestra grupos de acinos cromafines densamente marcados mientras otros no se marcan en absoluto (Fig. 9F, H). Esto confirmaría la visión tradicional que considera que existen grupos de células adrenérgicas, exclusivamente secretoras de adrenalina, y otros de células noradrenérgicas. El marcaje a bajo aumento sugiere una mayor intensidad en ciertas áreas cercanas a la corteza, cuyas secreciones podrían influir en la expresión de la enzima (Coupland y MacDougall, 1966). Entre ambos extremos hay una gama de intensidades de marcaje que podrían responder, como se sugirió para la TH, a una cantidad de expresión variada de la enzima (Park y col., 1986). Ciolkowski y colaboradores (1992), empleando la técnica de voltametría cíclica, han descrito la existencia de células cromafines capaces de liberar tanto adrenalina como noradrenalina, que llegarían a ser un 25% del total; este dato sería una prueba más de la heterogeneidad de las células cromafines en cuanto a su característica principal de fabricar y liberar adrenalina y noradrenalina.

La polarización de las células cromafines se ha observado en estudios ultraestructurales de rata y ternero (Coupland, 1965a, Aunis y Garcia, 1981). Con la inmunofluorescencia diseñada para la figura 10 se pretende observar esta polarización en grupos de células cromafines *in situ* a menor aumento y por tanto obtener una visión de la organización del sistema. La imagen muestra como los núcleos de las células cromafines marcados con Hoechst en color azul, se alinean en un extremo de la célula cromafín cuyo citoplasma se ha teñido con un anticuerpo contra la TH y una inmunoglobulina conjugada con un fluoróforo verde. El polo opuesto al núcleo, en el que se encuentran las vesículas secretoras se sitúa cerca de los vasos.

2.- La innervación colinérgica y la distribución de la ACE

La innervación de la médula adrenal ha sido objeto de interés en numerosos trabajos muchos de ellos centrados en averiguar su procedencia (Elliot, 1913, Ellison y Clark, 1975, Haase y col., 1982, Kesse y col., 1988, Mohamed y col., 1988), y otros en identificar distintos tipos de fibras además de las colinérgicas como por ejemplo fibras que contienen sustancia P, neuropéptido Y u otros neuropéptidos (Kuramoto y col., 1985, Kondo y col., 1986). Coupland ha descrito con extraordinario detalle la ultraestructura de la médula adrenal de rata incluyendo la innervación a gran aumento (Coupland, 1965b, 1965a).

La técnica de marcaje de la ACE se ha empleado en cobayo, rata, conejo y primate (mono tití) (Coupland y Holmes, 1958, Parker y col., 1993). La intención de estas investigaciones era demostrar la existencia de fibras colinérgicas y describir *grosso modo* su distribución en la glándula. Kajiwara y colaboradores (1997) cuantifican, empleando la tinción de Bodian en rata en uno de los escasos estudios cuantitativos, el número de terminaciones que hacen sinapsis con una célula cromafín y llegan a la conclusión de que ese número es de entre 1 y 4. Tomlison y Coupland (1990) estiman que el promedio de sinapsis por célula cromafín es de 5.4, también en la rata pero utilizando microscopía electrónica. En el modelo bovino adulto, a pesar de que los trabajos con su célula adrenocromafín medular se cuentan por centenares, no existían datos en la literatura sobre la innervación colinérgica, aunque sí se ha descrito, empleando fracciones de homogenados de tejido, la presencia de ACE tanto en la membrana de la célula como en distintas organelas (Bon y col., 1990, Michaelson y col., 1994). Además las células cromafines bovinas liberan ACE cuando se les aplica algún estímulo despolarizante en presencia de Ca^{2+} , lo que sugiere que la ACE se expulsa también por exocitosis, quizás en las mismas vesículas catecolaminérgicas o en otras específicas (Mizobe y Livett, 1983, Mizobe y col., 1984, Small y col., 1993). Todos estos datos sugieren la importancia de la ACE en la fisiología de la médula adrenal. Partiendo de la suposición de que el patrón de innervación es un determinante importante de la clase de estímulos que una célula postsináptica puede recibir, la tinción con ACE nos permitiría ver la distribución de la ACE y la innervación colinérgica de las células cromafines de la médula adrenal bovina.

El marcaje demuestra una casi total ausencia de fibras colinérgicas en la zona cortical (Fig. 11A, B). Por el contrario gruesos haces de nervios atraviesan la médula,

muchos en paralelo a los vasos. La observación de la distribución de los haces en los cortes transversales y longitudinales sugiere una organización particular de las fibras colinérgicas que inervan la médula adrenal bovina: Los tractos nerviosos entrarían por alguna zona, y se dirigirían al área central atravesando la glándula junto con los vasos que se encuentran alrededor de la vena adrenomedular central. A partir de estos tractos se irían derivando haces de fibras que se dirigirían a inervar la células cromafines. La microfotografía de la figura 11E apoya esta posibilidad; en ella numerosas fibras nerviosas abandonan un tracto nervioso cortado transversalmente y se dirigen a inervar varias células cromafines.

La tinción muestra un profuso marcaje de las células cromafines que por lo tanto contienen ACE bien en su membrana bien en alguna organela en el interior, confirmando los datos previos obtenidos en fracciones celulares antes mencionados. Además se observan botones sinápticos distribuidos a lo largo del camino de las fibras nerviosas, lo que sugiere que las células cromafines bovinas tiene unas o varias sinapsis.

El marcaje de la ACE y su distribución en la médula adrenal bovina es compatible con las siguientes conclusiones: i) La médula adrenal bovina está dotada de una abundante inervación colinérgica, lo que sugiere la posibilidad de un control minucioso de la secreción; y ii) parece que la rápida terminación del estímulo colinérgico es importante dada la abundante presencia de ACE, y el hecho descrito previamente (Mizobe y Livett, 1983, Mizobe y col., 1984, Small y col., 1993) de que también se libere ante un estímulo despolarizante. Estas conclusiones apoyan la hipótesis de que la excitabilidad colinérgica y la secreción de catecolaminas por la célula cromafín bovina están precisamente controladas por la estimulación colinérgica.

3.- Excitabilidad de la célula cromafín bovina

3.1. El K^+ y el Na^+ controlan el potencial de membrana en reposo

La membrana de la célula cromafín en estado de reposo, como la de otras células excitables, es permeable sobre todo al K^+ . Puesto que este catión se encuentra en altas concentraciones en el interior de la célula y en bajas en el medio extracelular, la diferencia de potencial entre el interior y exterior de la célula será negativa y debería alcanzar unos -85 mV, según predice la ecuación de Nernst para el potencial de equilibrio del K^+ , calculado con la $[K^+]$ de las soluciones intra y extracelulares usadas (Hille, 2001). Como se ha apuntado en el epígrafe 2.1 de Resultados, el potencial de membrana medido experimentalmente es de unos -52 mV. Esta diferencia entre el valor

experimental y el esperado indica que la membrana también es permeable a otros iones cuyo potencial de equilibrio es más positivo que el del K^+ . En concreto, al Na^+ y al Cl^- (A. R. Artalejo, 1995). Goldman, Hodgkin y Katz (GHK) propusieron una ecuación que, tomando en cuenta las permeabilidades relativas de estos tres iones, proporciona una mejor aproximación al valor real. En la figura 15B vemos que los valores experimentales encontrados ante la exposición de una célula cromafín a distintas concentraciones de K^+ extracelular se aproximan bastante bien a los valores calculados con esta ecuación, excepto para el caso en que no hay K^+ extracelular. En este caso es posible que la pequeña permeabilidad al Na^+ cobre más importancia y por ello el potencial de membrana esté más despolarizado que lo predicho por la ecuación GHK.

Para comprobar la permeabilidad al Na^+ , cuyo potencial de equilibrio es de unos +70 mV, se procedió a hacer algunos experimentos perfundiendo una solución en la que se ha eliminado este catión y se ha substituido, para mantener la osmolaridad, con n-metil-d-glucamina⁺. En este caso, es esperable una ligera hiperpolarización de la célula; esto es de hecho lo que se observa experimentalmente. A pesar de que la membrana es también permeable al Cl^- , este ión no parece tener gran importancia en condiciones basales (Nassar-Gentina y col., 1988); posiblemente su potencial de equilibrio es similar al potencial de reposo de la célula (alrededor de unos -50 mV). Es curioso que la hiperpolarización producida por la ausencia de Na^+ no es constante, sino que se recupera lentamente el valor aproximado del potencial de membrana en reposo; un posible responsable de este comportamiento es la permeabilidad a los iones Cl^- , que abandonan la célula por la tendencia del anión a alcanzar de nuevo su potencial de equilibrio.

3.2. Sobre la perfusión prolongada de agonistas colinérgicos

Se han empleado abundantemente agonistas colinérgicos para el estudio de la excitabilidad y la secreción en la célula cromafín tanto en célula aislada como en otras preparaciones (por ejemplo Douglas y Rubin, 1961a, 1961b, A. R. Wakade y Wakade, 1983, Finnegan y col., 1996, Perez-Alvarez y Albillos, 2007, Arnaiz-Cot y col., 2008, de Diego y col., 2008b). Se asumía que el agonista fisiológico liberaría las catecolamina de manera similar a la estimulación esplácnica. En la figura 14A se observa el efecto sobre el potencial de membrana de la célula cromafín de una concentración baja de AC (30 μ M). Surge la pregunta de si es posible que estas despolarizaciones sostenidas se den en condiciones fisiológicas. Dada la disposición ubicua de la AC y el número de

pequeño de sinapsis por célula cromafín, parece muy improbable que se pueda mantener un estímulo de esta clase durante largos periodos de tiempo.

Por otro lado, podría ser que la concentración probada de AC fuera demasiado grande. Se han probado concentraciones menores de AC (datos no mostrados), que evocan el disparo de potenciales de acción sobre un potencial de membrana ligeramente despolarizado y aumentado la amplitud de las fluctuaciones de la basal. Es este un resultado similar a la perfusión de una concentración baja del agonista nicotínico nicotina 3 μ M (Fig. 14B). Sin embargo estos estímulos producen muy poca o ninguna secreción (de Diego y col., 2008b, Tapia y col., 2009), lo cual parece incompatible con la rápida y masiva secreción de catecolaminas que debe darse en una situación de alarma.

Por lo tanto una concentración moderada de AC, aplicada de forma continuada produce una despolarización más o menos estable de la membrana pero bloquea el disparo de potenciales de acción. Una concentración baja de larga duración por el contrario, dispara potenciales de acción pero es incapaz de sostener una secreción vigorosa. Una hipótesis compatible con estos datos sería que la estimulación colinérgica de la célula cromafín se produce de manera breve y localizada, con altas concentraciones de AC en la hendidura sináptica que inducirían el disparo de potenciales de acción a distintas frecuencias.

3.3. Potenciales de acción evocados por perfusión rápida e intermitente de AC

El nervio espláncnico libera acetilcolina (AC) (Feldberg y Mintz, 1932) que estimula a la célula cromafín para que dispare PA. La estimulación de los espláncnicos en preparaciones de rodajas de médula adrenal produce corrientes nicotínicas en células cromafines *in situ* (Holman y col., 1994, Kajiwara y col., 1997, Barbara y col., 1998). La liberación secuencial de “cuantos” (el contenido de AC de una vesícula) de AC podría producir uno o varios potenciales de acción. Neher et al (1982) indican que, debido a la alta resistencia de la membrana de la célula cromafín, la corriente generada por la activación de sólo uno o unos pocos receptores nicotínicos sería suficiente para producir el disparo de un potencial de acción en la célula cromafín bovina; también demuestran como una corriente nicotínica medida con la técnica de “patch-clamp” en configuración de célula adherida viene seguida de inmediato y con alta probabilidad del disparo de un potencial de acción. Se ha emulado esta estimulación cuántica, intermitente mediante la perfusión rápida de AC. Para ello se construyó un sistema de

perfusión capaz de profundir y lavar completamente el agonista en unos 80 ms. Esto permitió producir un solo PA por pulso a una frecuencia no mayor de 1 Hz.

Muchos de los potenciales de acción generados acababan en una especie de joroba probablemente debida a la larga Es interesante sin embargo, el observar en la literatura previa registros de similares características realizados en rodajas de tejido en las que la AC se liberaba de forma endógena tras una estimulación eléctrica de campo o del nervio colinérgico correspondiente. Holman y col (1994) lo observaron en rodaja de médula adrenal de rata y McLachlan y Meckler (1989) en ganglio celíaco de cobayo. Esto podría ser una indicación de que incluso en condiciones “fisiológicas”, una liberación masiva de AC podría desbordar los mecanismos de aclarado del neurotransmisor de la sinapsis.

4.- Secreción evocada por potenciales de acción en la célula cromafín bovina

4.1. Corrientes de Ca^{2+} y exocitosis producidas por PD y trenes de PA

Varios estudios han analizado la relación entre la entrada de Ca^{2+} y las exocitosis en la célula cromafín. Augustine y Neher (1992) dializaron células cromafines bovinas con soluciones de concentraciones conocidas de Ca^{2+} y midieron los incrementos en la capacidad de la membrana (Cm). Heinemann y colaboradores (1993), en células cromafines bovinas, utilizaron cafeína y encontraron una relación de una potencia de 3 entre la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ medida con Fura2 y la exocitosis medida con la técnica de la Cm . Engisch y colaboradores (1996 y 1997) empleando PD encontraron que la relación entre entrada de Ca^{2+} en células cromafines bovinas, medida como la integral de la corriente de Ca^{2+} , y la exocitosis medida con la técnica de la Cm seguía una potencia de 1.5. También se ha empleado la fotoliberación de Ca^{2+} (Neher y Zucker, 1993) para producir aumentos rapidísimos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evitando la necesidad de que el Ca^{2+} entre por los canales de la membrana plasmática o sea liberado de alguna organela intracelular; la fotoliberación de Ca^{2+} resultó ser mucho más eficaz produciendo exocitosis que los PD (Vitale y col., 1995, Voets y col., 1999).

También se ha usado trenes de patrones de voltaje similares a los PA para medir la respuesta exocitótica con amperometría y/o Cm (Zhou y Misler, 1995, Chan y Smith, 2001). Sin embargo, la relación Ca^{2+} -exocitosis en la célula cromafín no había sido medida utilizando el patrón más fisiológico de trenes de potenciales de acción. En esta tesis se ha estudiado esta relación comparando dos patrones de estimulación tan dispares como son los PD y los trenes de pulsos de PA. Empleamos una frecuencia alta

de aplicación de los PA, 30 Hz, que es aproximadamente la máxima que puede darse en la célula cromafín bovina según se ha comprobado en el apartado 2.6, con la idea de comparar la máxima frecuencia de estimulación alcanzable la estimulación más fisiológica, con otra estimulación mucho más fuerte como es la despolarización continua de los PD.

La relación Q_{Ca} -tiempo de estimulación fue lineal para los trenes de PA mientras que se desviaba de la linealidad con los PD. Una posible explicación para esta diferencia, podría ser la menor inactivación de la corriente de Ca^{2+} cuando la célula era estimulada de manera intermitente con trenes de PA. Con cada PA entra una pequeña cantidad de Ca^{2+} y entre el primero y el segundo PA hay una marcada inactivación (aproximadamente un 17%, Fig. 27F), pero después la inactivación es mucho más lenta (Figura 22B, D, F). Por ello, la velocidad de la entrada de Ca^{2+} será más o menos constante durante la duración del tren lo que explicaría la linealidad. En el caso de los PD, la rápida entrada de Ca^{2+} inicial se inactiva rápidamente y alcanza prácticamente la línea basal antes de acabar los pulsos más largos (Figura 22A, C, E). Así en los PD de corta duración la relación Q_{Ca} -tiempo del estímulo tiene una pendiente muy pronunciada, mientras que con los pulsos más largos, esta pendiente disminuye llegando incluso a hacerse menor que con los PA (Figura 26B). Cuando se refleja sólo el tiempo de apertura de los canales de Ca^{2+} , estimando que este es de unos 9.5 ms en los PA, las dos curvas se aproximan mucho (Figura 26D).

La relación entrada de Ca^{2+} -Cm seguía una tendencia lineal con ambos tipos de estimulación cuando la entrada de Ca^{2+} era pequeña (Figura 26E). Cuando el tiempo de estimulación de los PD se alargaba, la relación se desviaba de la linealidad mientras que se mantenía lineal con los trenes de PA, lo cual parece indicar que esta relación lineal sería la respuesta característica de la estimulación con PAs en estas condiciones.

Otra diferencia notable entre ambos tipos de estimulación, es que el incremento de la Cm (ΔCm) producido por los trenes de PA no caía a lo largo de los 8 segundos posteriores a la estimulación. Por el contrario los PD, sobre todo los de más larga duración, evocaron una caída de la Cm en el período posterior a la estimulación (Figuras 22 y 23). Los experimentos en los que se midió la secreción simultáneamente con amperometría y ΔCm demuestran sólo hay exocitosis como mucho un par de s más allá del final de la estimulación, ya sea ésta PD o tren de PA (Figura 23). Por lo tanto las pronunciadas caídas en el trazo de la Cm medidas durante los 8 s posteriores a los estímulos PD de más duración tienen que ser debidas a endocitosis. En cambio cuando

los PD son de corta duración con trenes de PA, la célula recobra su tamaño original con un mecanismo de endocitosis lenta que puede durar minutos. La endocitosis rápida podría ser un mecanismo de seguridad frente a incrementos grandes de la superficie de la membrana que pongan en peligro la integridad de la célula, como por ejemplo los debidos a algún cambio osmótico (Perez Bay y col., 2007). Seguramente esto se dé raramente en situaciones fisiológicas (Smith y Neher, 1997). Componentes rápidos y lentos de la endocitosis se han descrito en varios trabajos que emplean diversas combinaciones de PD como estímulo (Burgoyne, 1995, Smith y Neher, 1997, Engisch y Nowycky, 1998). Se ha propuesto que la endocitosis rápida depende de calmodulina y dinamina-1 (A. R. Artalejo, 1995, C. R. Artalejo y col., 2002), mientras que la endocitosis lenta se ha asociado a clatrina, calcineurina y dinamina 2 (A. R. Artalejo, 1995, Engisch y Nowycky, 1998, C. R. Artalejo y col., 2002). Chan y Smith (2001) estudian la endocitosis evocada por trenes de pulsos de voltaje similares a los potenciales de acción y demuestran que hay una endocitosis importante durante un tren de pulsos de 300 PA aplicados a una frecuencia de 16 Hz. El hecho de que haya endocitosis durante el tren complica la interpretación de la relación Q_{Ca} -Cm. Aun así no invalida los resultados pues dicha endocitosis comienza a activarse 3 o 4 segundos después de comenzar el pulso; en los resultados presentados en esta tesis, a la frecuencia de 30 Hz, el tren más largo aplicado de 100 PA dura 3.3 s, y es muy posible que en este tiempo no se haya activado el proceso de endocitosis rápida que retiraría grandes cantidades de membrana, pues parece necesitar de grandes Ca^{2+} para activarse como sugiere el hecho de que se observe sobre todo con PD largos.

4.2. Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ inducidos por PD y trenes de PA

La cinética del $[Ca^{2+}]_c$ también mostró marcadas diferencias según el tipo de estímulo aplicado. Cuando se aplicaron trenes de 100 PA, los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ tardaron más en alcanzar su máximo y el aclarado del catión del citosol (resultado de la internalización en organelas como la mitocondria o el retículo endoplásmico, y de la acción de las bombas de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática) fue más rápido que con PD de la misma duración. Se ha propuesto que existe una población de mitocondrias cercanas a la membrana plasmática que podrían tamponar la entrada de grandes cantidades de Ca^{2+} captándolo a través de su uniportador (Montero y col., 2000, Villalobos y col., 2002); este uniportador necesita que la $[Ca^{2+}]_c$ suba a varios micromolar para comenzar a funcionar. Cuando la estimulación se realiza con PA, esta

población de mitocondrias captaría menos Ca^{2+} y más lentamente que con PD; en este último caso la mitocondria captaría grandes cantidades de Ca^{2+} que se iría liberando lentamente al citosol, por lo que el aclarado sería más lento y la señal de Ca^{2+} tardaría más en volver a la basal. Es posible que con los trenes de PA los tampones de Ca^{2+} citosólico no se saturen lo que explicaría la linealidad en la relación $Q_{\text{Ca}}\text{-Cm}$; en los PD en cambio habría una saturación a las pocas decenas o cientos de ms de entrada continuada de Ca^{2+} , lo que produciría una inactivación Ca^{2+} -dependiente de los canales de Ca^{2+} (Villarroya y col., 1999, Hernandez-Guijo y col., 2001).

5.- Modulación de la excitabilidad, las corrientes de Ca^{2+} y la secreción

Tanto las terminaciones de los nervios espláncnicos como las propias vesículas de las células cromafines contienen péptidos opioides que liberan junto con otros neurotransmisores (Schultzberg y col., 1978, Livett y col., 1981). Parece lógico pensar que podrían tener algún efecto sobre la excitabilidad de la membrana. Sin embargo en célula cromafín no se ha comprobado su posible efecto sobre este parámetro. Para estudiarlo se diseñó un experimento con el que se podía comprobar a la vez el efecto sobre el potencial de membrana y sobre el disparo de potenciales de acción, parámetros ambos importantes en condiciones fisiológicas. Para ello, se evocó el disparo controlado de PA mediante uno de los métodos descritos en esta tesis (Apartado 2) y se comprobó el efecto de la perfusión de m.e. uno de los péptidos opioides presentes en la médula adrenal. La m.e. produjo una ligera despolarización y un fuerte efecto sobre los potenciales de acción, disminuyendo la amplitud del PA y la de la posthiperpolarización. Puesto que la m.e. inhibe parcialmente la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, es posible que el efecto sobre la fase de posthiperpolarización del PA sea debido a que la menor entrada de Ca^{2+} activa menor cantidad de canales de $\text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$ dependientes (SK y BK) de gran importancia en las fases de repolarización y posthiperpolarización del potencial de membrana. El efecto sobre la amplitud puede deberse a la ligera despolarización que se produce, lo que reduciría el número de canales de Na^+ activos.

La función de estas sustancias co-liberadas se ha estudiado intensamente en la célula cromafín. Se ha descrito con precisión los efectos de diversas sustancias moduladoras como pequeños péptidos opioides o ATP sobre las corrientes de Ca^{2+} y Ba^{2+} evocadas con pulsos despolarizantes cuadrados (véase Introducción). En los experimentos realizados en esta tesis vemos como en efecto la m.e. inhibe la secreción,

pero esta inhibición se da sobre todo en los primeros 50 PA. Quizás la m.e. actúe como protección evitando una secreción masiva de catecolaminas en periodos de alta estimulación nerviosa.

La información disponible sobre el efecto de estas sustancias sobre la secreción es menor. Dado que muchas de ellas inhiben la entrada de Ca^{2+} era esperable un efector inhibitor sobre la exocitosis como de muestran Ulate y colaboradores (2000). Parece que también se activa alguna cascada de señalización intracelular mediada por proteína G y PKC que modularía la secreción de manera independiente de los canales de Ca^{2+} de membrana (Chen y col., 2005). En esta tesis comprobamos que se endentece la exocitosis y se reduce el salto de capacidad. Esto es muy probablemente debido a la disminución en la entrada de Ca^{2+} , pues el efecto es más notable al principio. Otros posibles mecanismos como los sugeridos por Chen y colaboradores (2005) quedan por investigar. Es curioso el efecto “rebote” en la secreción en el pulso de lavado. Una posible explicación es que haya habido un acercamiento o una preparación de vesículas debida al Ca^{2+} que ha entrado con el pulso anterior y no ha sido suficiente para producir la fusión y exocitosis de un número importante de vesículas. La propia sustancia moduladora también podría activar alguna cascada de señalización con influencia sobre el transporte de vesículas.

6.- Comparación del modelo experimental de célula cromafín en cultivo con otros modelos

En esta tesis se han empleado células cromafines bovinas disgregadas de sus tejidos originales por métodos enzimáticos y mantenidas en cultivo primario. Los cultivos presentan ciertas ventajas: se puede trabajar con ellos durante varios días, son relativamente fáciles de mantener, se pueden aislar una célula única e incluso separar tipos celulares por centrifugación diferencial. Sin embargo presentan el inconveniente de que la célula está separada de su entorno fisiológico natural. En otras preparaciones como por ejemplo la glándula perfundida o la rodaja de médula adrenal se conserva la célula en su ambiente original. La preparación de rodaja de médula adrenal se ha empleado en dos especies de roedores, la rata y el ratón, para realizar estudios electrofisiológicos (Barbara y Takeda, 1996, Voets y col., 1999, Martin y col., 2001, Garcia-Fernandez y col., 2007). Con esta preparación se pueden estimular fibras espláncicas y medir la respuesta de células cromafines (Barbara y Takeda, 1996), o estudiar el efecto de las uniones estrechas entre células cromafines (Colomer y col.,

2009). En esta tesis se ha intentado realizar un acercamiento a la posible fisiología de la excitación-secreción de la célula cromafín; indudablemente el estudio con rodajas de médula adrenal es imprescindible para alcanzar un preciso conocimiento de la fisiología de esta célula. Sin embargo no todas las aproximaciones experimentales se pueden llevar a cabo en la rodaja. Por ejemplo la perfusión rápida y focal permite aplicar una concentración conocida de una sustancia durante un tiempo determinado, lo cual es prácticamente imposible en la rodaja. Ambas clases de técnicas pueden producir informaciones complementarias que sirvan para conocer mejor la fisiología de la médula adrenal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL

De los resultados presentados en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- i) Cada célula cromafín de la médula adrenal bovina está innervada por unas pocas fibras colinérgicas que se encargan de controlar con precisión su excitabilidad.
- ii) La médula adrenal bovina posee acetilcolinesterasa en abundancia localizada estratégicamente cerca de las sinapsis, ello indica la importancia de la terminación rápida del estímulo colinérgico.
- iii) La célula cromafín bovina en cultivo puede disparar potenciales de acción espontáneamente, y su potencial de membrana se mantiene gracias a la permeabilidad de la membrana en reposo a los iones K^+ y Na^+ .
- iv) El experimentador puede controlar la frecuencia de disparo de potenciales de acción en la célula cromafín a voluntad de varias maneras: mediante la perfusión rápida de pulsos de acetilcolina a frecuencias limitadas por las características del sistema de perfusión o con patrones de inyección de corrientes despolarizantes que remedan corrientes excitadoras postsinápticas.
- v) La frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción en la célula cromafín ha sido de uno 30-35 Hz en todas las condiciones probadas.
- vi) Las corrientes de Ca^{2+} se mantienen aproximadamente estables, tras una cierta inactivación después de los primeros potenciales de acción, cuando se estimulan células cromafines en cultivo con trenes de potenciales de acción a 30 Hz. Esto puede explicar la relación lineal entrada de Ca^{2+} - exocitosis que se da con esta estimulación. La inactivación en los pulsos despolarizantes cuadrados es continua durante la duración del pulso y su relación Ca^{2+} - exocitosis no es lineal.
- vii) La exocitosis evocada por cualquiera de los estímulos usados se da durante el estímulo y a lo sumo 1-2 s después con los más fuertes.
- viii) Apenas se detecta endocitosis tras los trenes de potenciales de acción mientras que la endocitosis es muy pronunciada con los pulsos despolarizantes más largos. En estas condiciones es posible que la

endocitosis tras los trenes de potenciales de acción sea lenta y dure varios minutos.

- ix) La metionina-enkefalina, un péptido opioide co-almacenado en las vesículas cromafines y en las terminaciones nerviosas esplácnicas, modula negativamente la excitabilidad de la membrana, el disparo de potenciales de acción, las corrientes de Ca^{2+} y la exocitosis.

En conjunto, esta tesis doctoral sienta las bases para un abordaje más fisiológico de los mecanismos que subyacen al acoplamiento excitación-secreción en células cromafines aisladas y en rodajas de médula adrenal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aggett PJ, Fenwick PK y Kirk H. (1982). "The effect of amphotericin B on the permeability of lipid bilayers to divalent trace metals". **Biochim Biophys Acta** 684, 291-294.
2. Albillos A, Carbone E, Gandia L, Garcia AG y Pollo A. (1996a). "Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence". **Eur J Neurosci** 8, 1561-1570.
3. Albillos A, Gandia L, Michelena P, Gilabert JA, del Valle M, Carbone E y Garcia AG. (1996b). "The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells". **J Physiol** 494 (Pt 3), 687-695.
4. Arnaiz-Cot JJ, de Diego AM, Hernandez-Guijo JM, Gandia L y Garcia AG. (2008). "A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors". **Biochem Biophys Res Commun** 365, 413-419.
5. Artalejo AR. (1995). "Electrical properties of adrenal chromaffin cells". En **The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells**, pp. 259-299. CRC Press, Boca Raton, Florida.
6. Artalejo CR, Elhamdani A y Palfrey HC. (2002). "Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells". **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 6358-6363.
7. Augustine GJ y Neher E. (1992). "Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells". **J Physiol** 450, 247-271.
8. Aunis D y Garcia AG. (1981). "Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes". **Br J Pharmacol** 72, 31-40.
9. Bacha WJ y Bacha LM. (2006). "16. Endocrine System". En **Color Atlas of Veterinary Histology**, pp. 191-202. Blackwell Publishing.
10. Barbara JG, Poncer JC, McKinney RA y Takeda K. (1998). "An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation". **J Neurosci Methods** 80, 181-189.
11. Barbara JG y Takeda K. (1996). "Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland". **Proc Natl Acad Sci U S A** 93, 9905-9909.
12. Biales B, Dichter M y Tischler A. (1976). "Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells". **J Physiol** 262, 743-753.
13. Bittner MA y Holz RW. (1992). "Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components". **J Biol Chem** 267, 16219-16225.

14. Blaschko H. (1954). "Metabolism of epinephrine and norepinephrine". **Pharmacol Rev** 6, 23-28.
15. Blaschko H. (1957). "Formation of catechol amines in the animal body". **Br Med Bull** 13, 162-165.
16. Bon S, Bader MF, Aunis D, Massoulie J y Henry JP. (1990). "Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells. Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase?" **Eur J Biochem** 190, 221-232.
17. Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y y Miyazaki S. (1976). "Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine". **J Physiol** 263, 417-439.
18. Britton SW y Silvette H. (1932). "The Apparent Prepotent Function of the Adrenal Glands". **Science** 75, 644-646.
19. Burgoyne RD. (1995). "Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca²⁺ current run-down". **Pflugers Arch** 430, 213-219.
20. Cannon WB. (1915). "The General Organization of the Visceral Nerves Concerned in Emotions". En **Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage**, pp. 22-39. D. Appleton and Company, New York.
21. Cassell JF, Clark AL y McLachlan EM. (1986). "Characteristics of phasic and tonic sympathetic ganglion cells of the guinea-pig". **J Physiol** 372, 457-483.
22. Ciolkowski E, Cooper B, Jankowski J, Jorgenson J y Wightman RM. (1992). "Direct observation of epinephrine and norepinephrine cosecretion from individual adrenal medullary chromaffin cells". **J Am Chem Soc** 114, 2815-2821.
23. Colomer C, Desarmenien MG y Guerineau NC. (2009). "Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication". **Mol Neurobiol** 40, 87-100.
24. Colliver TL, Hess EJ y Ewing AG. (2001). "Amperometric analysis of exocytosis at chromaffin cells from genetically distinct mice". **J Neurosci Methods** 105, 95-103.
25. Cooper AJ y Stanford IM. (2000). "Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro". **J Physiol** 527 Pt 2, 291-304.
26. Coupland RE. (1965a). "(Electron Microscopic Observations on the Structure of the Rat Adrenal Medulla. I. the Ultrastructure and Organization of Chromaffin Cells in the Normal Adrenal Medulla.)". **J Anat** 99, 231-254.
27. Coupland RE. (1965b). "Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation". **J Anat** 99, 255-272.

28. Coupland RE y Holmes RL. (1958). "The distribution of cholinesterase in the adrenal glands of the rat, cat and rabbit". **J Physiol** 141, 97-106.
29. Coupland RE y MacDougall JD. (1966). "Adrenaline formation in noradrenaline-storing chromaffin cells in vitro induced by corticosterone". **J Endocrinol** 36, 317-324.
30. Criado M, Dominguez del Toro E, Carrasco-Serrano C, Smillie FI, Juiz JM, Viniegra S y Ballesta JJ. (1997). "Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1". **J Neurosci** 17, 6554-6564.
31. Chan SA y Smith C. (2001). "Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells". **J Physiol** 537, 871-885.
32. Chen XK, Wang LC, Zhou Y, Cai Q, Prakriya M, Duan KL, Sheng ZH, Lingle C y Zhou Z. (2005). "Activation of GPCRs modulates quantal size in chromaffin cells through G(betagamma) and PKC". **Nat Neurosci** 8, 1160-1168.
33. de Diego AM, Arnaiz-Cot JJ, Hernandez-Guijo JM, Gandia L y Garcia AG. (2008a). "Differential variations in Ca²⁺ entry, cytosolic Ca²⁺ and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells". **Acta Physiol (Oxf)** 194, 97-109.
34. de Diego AM, Tapia L, Alvarez RM, Mosquera M, Cortes L, Lopez I, Gutierrez LM, Gandia L y Garcia AG. (2008b). "A low nicotine concentration augments vesicle motion and exocytosis triggered by K(+) depolarisation of chromaffin cells". **Eur J Pharmacol** 598, 81-86.
35. Deisz RA y Lux HD. (1985). "gamma-Aminobutyric acid-induced depression of calcium currents of chick sensory neurons". **Neurosci Lett** 56, 205-210.
36. Douglas WW. (1968). "Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells". **Br J Pharmacol** 34, 453-474.
37. Douglas WW, Kanno T y Sampson SR. (1967a). "Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture". **J Physiol** 188, 107-120.
38. Douglas WW, Kanno T y Sampson SR. (1967b). "Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine". **J Physiol** 191, 107-121.
39. Douglas WW y Rubin RP. (1961a). "Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling". **Nature** 192, 1087-1089.
40. Douglas WW y Rubin RP. (1961b). "The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine". **J Physiol (Paris)** 159, 40-57.

41. Duan K, Yu X, Zhang C y Zhou Z. (2003). "Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells". **J Neurosci** 23, 11235-11243.
42. Dunlap K y Fischbach GD. (1981). "Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones". **J Physiol** 317, 519-535.
43. Elliot TR. (1913). "The innervation of the adrenal glands". **Journal of Physiology** 46, 285-290.
44. Ellison JP y Clark MG. (1975). "Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in peripheral autonomic nerves". **J Comp Neurol** 161, 103-113.
45. Engisch KL, Chernevskaya NI y Nowycky MC. (1997). "Short-term changes in the Ca^{2+} -exocytosis relationship during repetitive pulse protocols in bovine adrenal chromaffin cells". **J Neurosci** 17, 9010-9025.
46. Engisch KL y Nowycky MC. (1996). "Calcium dependence of large dense-cored vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells". **J Neurosci** 16, 1359-1369.
47. Engisch KL y Nowycky MC. (1998). "Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells". **J Physiol** 506 (Pt 3), 591-608.
48. Feldberg W y Mintz B. (1932). "Die wirkung von azetylcholin auf die nebennieren". **Arch Exp Path Pharmacol**, 287-291.
49. Fenwick EM, Fajdiga PB, Howe NB y Livett BG. (1978). "Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells". **J Cell Biol** 76, 12-30.
50. Fenwick EM, Marty A y Neher E. (1982a). "A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine". **J Physiol** 331, 577-597.
51. Fenwick EM, Marty A y Neher E. (1982b). "Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells". **J Physiol** 331, 599-635.
52. Finnegan JM, Borges R y Wightman RM. (1996). "Comparison of cytosolic Ca^{2+} and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells". **Neuroscience** 71, 833-843.
53. Friedman JE, Lelkes PI, Lavie E, Rosenheck K, Schneeweiss F y Schneider AS. (1985). "Membrane potential and catecholamine secretion by bovine adrenal chromaffin cells: use of tetraphenylphosphonium distribution and carbocyanine dye fluorescence". **J Neurochem** 44, 1391-1402.
54. Fujita T. (1989). "Present status of paraneuron concept". **Arch Histol Cytol** 52 Suppl, 1-8.

55. Gandia L, Garcia AG y Morad M. (1993). "ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells". **J Physiol** 470, 55-72.
56. Garcia-Fernandez M, Mejias R y Lopez-Barneo J. (2007). "Developmental changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices". **Pflugers Arch** 454, 93-100.
57. Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R y Garcia-Sancho J. (2006). "Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells". **Physiol Rev** 86, 1093-1131.
58. Guyton AC y Hall JE. (2006a). "The autonomic nervous system and the adrenal medulla". En **Textbook of Medical Physiology**, 11th edition edn, pp. 748 - 768. Elsevier Saunders, Philadelphia.
59. Guyton AC y Hall JE. (2006b). "Nervous regulation of the circulation, and rapid control of arterial pressure". En **Textbook of Medical Physiology**, pp. 204-215. Elsevier Saunders, Philadelphia.
60. Haase P, Contestabile A y Flumerfelt BA. (1982). "Preganglionic innervation of the adrenal gland of the rat using horseradish peroxidase". **Exp Neurol** 78, 217-221.
61. Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW y Eiden LE. (2002). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis". **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 461-466.
62. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". **Pflugers Arch** 391, 85-100.
63. Heinemann C, von Ruden L, Chow RH y Neher E. (1993). "A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells". **Pflugers Arch** 424, 105-112.
64. Hernandez-Guijo JM, Gandia L, Lara B y Garcia AG. (1998). "Autocrine/paracrine modulation of calcium channels in bovine chromaffin cells". **Pflugers Arch** 437, 104-113.
65. Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroja M, Garcia AG y Gandia L. (2001). "Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria". **J Neurosci** 21, 2553-2560.
66. Hille B. (2001). "Chapter 1". En **Ion Channels of Excitable Membranes**, pp. 1-22. Sinauer, Massachusetts.
67. Holman ME, Coleman HA, Tonta MA y Parkinson HC. (1994). "Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs". **J Physiol** 478 (Pt 1), 115-124.

68. Holz GG, Rane SG y Dunlap K. (1986). "GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels". **Nature** 319, 670-672.
69. Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA y Eberhard DA. (1989). "MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis". **J Biol Chem** 264, 5412-5419.
70. Hollins B y Ikeda SR. (1996). "Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells". **J Neurophysiol** 76, 1195-1211.
71. Horn R y Marty A. (1988). "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method". **J Gen Physiol** 92, 145-159.
72. Hullinger R y Andrisani OM. (1998). "15. Endocrine System". En **Dellman's Textbook of Veterinary Histology**, ed. Dellman HD, Eurell JA and Frappier LB, pp. 298-319. Blackwell Publishing.
73. Iijima T, Matsumoto G y Kidokoro Y. (1992). "Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye". **Neuroscience** 51, 211-219.
74. Jobling P y Lim R. (2008). "Anatomical and physiological properties of pelvic ganglion neurons in female mice". **Auton Neurosci** 140, 30-39.
75. Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME y Iijima T. (1997). "Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla". **Jpn J Physiol** 47, 449-464.
76. Kanno T. (1989). "The physiology and cell biology of paraneurons". **Arch Histol Cytol** 52 Suppl, 9-12.
77. Karnovsky MJ y Roots L. (1964). "A "Direct-Coloring" Thiocholine Method for Cholinesterases". **J Histochem Cytochem** 12, 219-221.
78. Kawagoe KT, Zimmerman JB y Wightman RM. (1993). "Principles of voltammetry and microelectrode surface states". **J Neurosci Methods** 48, 225-240.
79. Kesse WK, Parker TL y Coupland RE. (1988). "The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland". **J Anat** 157, 33-41.
80. Kidokoro Y, Miyazaki S y Ozawa S. (1982). "Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell". **J Physiol** 324, 203-220.
81. Kidokoro Y y Ritchie AK. (1980). "Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla". **J Physiol** 307, 199-216.

82. Kondo H, Kuramoto H y Fujita T. (1986). "An immuno-electron-microscopic study of the localization of VIP-like immunoreactivity in the adrenal gland of the rat". **Cell Tissue Res** 245, 531-538.
83. Koval LM, Yavorskaya EN y Lukyanetz EA. (2000). "Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures". **Neuroscience** 96, 639-649.
84. Kuramoto H, Kondo H y Fujita T. (1985). "Substance P-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intra-adrenal nerve fibers of rats". **Histochemistry** 82, 507-512.
85. Langley JN. (1903). "The autonomic nervous system". **Brain**, 1-26.
86. LeDouarin NM y Kalcheim C. (1999). "Chapter 5: The autonomic Nervous System and the Endocrine Cells of Neural Crest Origin". En **The Neural Crest**, second edn, pp. 197-251. Cambridge University Press
87. Lindau M y Fernandez JM. (1986). "IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels". **Nature** 319, 150-153.
88. Lindau M y Neher E. (1988). "Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells". **Pflugers Arch** 411, 137-146.
89. Livett BG, Dean DM, Whelan LG, Udenfriend S y Rossier J. (1981). "Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells". **Nature** 289, 317-319.
90. Livett BG, Fenwick EM, Fajdiga PB y Howe NBS. (1976). "A retrograde perfusion technique for high yield production of single chromaffin cells from the bovine adrenal gland". **Proc Aust Physiol Pharm Soc** 2, 108.
91. Lomax RB, Michelena P, Nunez L, Garcia-Sancho J, Garcia AG y Montiel C. (1997). "Different contributions of L- and Q-type Ca²⁺ channels to Ca²⁺ signals and secretion in chromaffin cell subtypes". **Am J Physiol** 272, C476-484.
92. Lovell PV y McCobb DP. (2001). "Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells". **J Neurosci** 21, 3429-3442.
93. Machado DJ, Montesinos MS y Borges R. (2008). "Good practices in single-cell amperometry". **Methods Mol Biol** 440, 297-313.
94. Magistretti J, Mantegazza M, Guatteo E y Wanke E. (1996). "Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine?" **Trends Neurosci** 19, 530-534.
95. Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C y Guerineau NC. (2001). "Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release". **J Neurosci** 21, 5397-5405.

96. Matthews EK. (1967). "Membrane potential measurement in cells of the adrenal gland". **J Physiol** 189, 139-148.
97. McLachlan EM y Meckler RL. (1989). "Characteristics of synaptic input to three classes of sympathetic neurone in the coeliac ganglion of the guinea-pig". **J Physiol** 415, 109-129.
98. Michaelson S, Small DH y Livett BG. (1994). "Expression of dimeric and tetrameric acetylcholinesterase isoforms on the surface of cultured bovine adrenal chromaffin cells". **J Cell Biochem** 55, 398-407.
99. Micheletti M, Brioschi A, Fesce R y Grohovaz F. (2005). "A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells". **Cell Mol Life Sci** 62, 95-104.
100. Mizobe F, Iwamoto M y Livett BG. (1984). "Parallel but separate release of catecholamines and acetylcholinesterase from stimulated adrenal chromaffin cells in culture". **J Neurochem** 42, 1433-1438.
101. Mizobe F y Livett BG. (1983). "Nicotine stimulates secretion of both catecholamines and acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells". **J Neurosci** 3, 871-876.
102. Mohamed AA, Parker TL y Coupland RE. (1988). "The innervation of the adrenal gland. II. The source of spinal afferent nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland". **J Anat** 160, 51-58.
103. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J y Alvarez J. (2000). "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion". **Nat Cell Biol** 2, 57-61.
104. Moro MA, Lopez MG, Gandia L, Michelena P y Garcia AG. (1990). "Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae". **Anal Biochem** 185, 243-248.
105. Mueller RA, Thoenen H y Axelrod J. (1969a). "Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy". **Science** 163, 468-469.
106. Mueller RA, Thoenen H y Axelrod J. (1969b). "Increase in tyrosine hydroxylase activity after reserpine administration". **J Pharmacol Exp Ther** 169, 74-79.
107. Nassar-Gentina V, Pollard HB y Rojas E. (1988). "Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland". **Am J Physiol** 254, C675-683.
108. Neher E y Marty A. (1982). "Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells". **Proc Natl Acad Sci U S A** 79, 6712-6716.

109. Neher E y Zucker RS. (1993). "Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells". **Neuron** 10, 21-30.
110. Nunez L, De La Fuente MT, Garcia AG y Garcia-Sancho J. (1995). "Differential Ca²⁺ responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues". **Am J Physiol** 269, C1540-1546.
111. Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroaya M y Lopez MG. (2006). "Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death". **Eur J Pharmacol** 553, 28-38.
112. Park DH, Ehrlich M, Evinger MJ y Joh TH. (1986). "Strain differences in distribution of phenylethanolamine N-methyltransferase activity from rat brain and adrenal gland". **Brain Res** 372, 185-188.
113. Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA y Afework M. (1993). "The innervation of the mammalian adrenal gland". **J Anat** 183 (Pt 2), 265-276.
114. Perez-Alvarez A y Albillos A. (2007). "Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells". **J Neurochem** 103, 2281-2290.
115. Perez Bay AE, Ibanez LI y Marengo FD. (2007). "Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells". **Am J Physiol Cell Physiol** 293, C1509-1522.
116. Plattner H, Artalejo AR y Neher E. (1997). "Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis". **J Cell Biol** 139, 1709-1717.
117. Rae J, Cooper K, Gates P y Watsky M. (1991). "Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B". **J Neurosci Methods** 37, 15-26.
118. Ross MH, Romrell LJ y Gordon IK. (1997). "20. Glándulas Endocrinas". En **Histología Texto y Atlas en Color**, pp. 594-632. Editorial Médica Panamericana.
119. Schultzberg M, Hokfelt T, Lundberg JM, Terenius L, Elfvin LG y Elde R. (1978). "Enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in sympathetic ganglia and adrenal medulla and in adrenal medullary gland cells". **Acta Physiol Scand** 103, 475-477.
120. Small DH, Michaelson S, Marley PD, Friedhuber A, Hocking A y Livett BG. (1993). "Regulation of acetylcholinesterase secretion from perfused bovine adrenal gland and isolated bovine chromaffin cells". **J Auton Nerv Syst** 42, 131-141.
121. Smith C y Neher E. (1997). "Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells". **J Cell Biol** 139, 885-894.

122. Sorensen JB. (2004). "Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles". **Pflugers Arch** 448, 347-362.
123. Sorensen JB, Fernandez-Chacon R, Sudhof TC y Neher E. (2003). "Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca^{2+} ". **J Gen Physiol** 122, 265-276.
124. Tapia L, Garcia-Eguiagaray J, Garcia AG y Gandia L. (2009). "Preconditioning stimuli that augment chromaffin cell secretion". **Am J Physiol Cell Physiol** 296, C792-800.
125. Tomlinson A y Coupland RE. (1990). "The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats". **J Anat** 169, 209-236.
126. Ulate G, Scott SR, Gonzalez J, Gilabert JA y Artalejo AR. (2000). "Extracellular ATP regulates exocytosis in inhibiting multiple Ca^{2+} channel types in bovine chromaffin cells". **Pflugers Arch** 439, 304-314.
127. Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J y Garcia-Sancho J. (2002). "Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells". **Faseb J** 16, 343-353.
128. Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de Pascual R, Lomax RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandia L y Garcia AG. (1999). "Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells". **J Physiol** 516 (Pt 2), 421-432.
129. Vitale ML, Seward EP y Trifaro JM. (1995). "Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis". **Neuron** 14, 353-363.
130. Voets T, Neher E y Moser T. (1999). "Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices". **Neuron** 23, 607-615.
131. von Ruden L y Neher E. (1993). "A Ca -dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells". **Science** 262, 1061-1065.
132. Wakade AR y Wakade TD. (1983). "Contribution of nicotinic and muscarinic receptors in the secretion of catecholamines evoked by endogenous and exogenous acetylcholine". **Neuroscience** 10, 973-978.
133. Wakade TD, Blank MA, Malhotra RK, Pourcho R y Wakade AR. (1991). "The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine secretion". **J Physiol** 444, 349-362.
134. Wallace DJ, Chen C y Marley PD. (2002). "Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current". **J Physiol** 540, 921-939.

- 135.** Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr. y Viveros OH. (1991). "Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells". **Proc Natl Acad Sci U S A** 88, 10754-10758.
- 136.** Winkler H, Sietzen M y Schober M. (1987). "The life cycle of catecholamine-storing vesicles". **Ann N Y Acad Sci** 493, 3-19.
- 137.** Wrobel KH y Suss F. (1999). "On the origin and prenatal development of the bovine adrenal gland". **Anat Embryol (Berl)** 199, 301-318.
- 138.** Xu ZJ y Adams DJ. (1992). "Resting membrane potential and potassium currents in cultured parasympathetic neurones from rat intracardiac ganglia". **J Physiol** 456, 405-424.
- 139.** Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS y Chiamvimonvat N. (2002). "Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice". **Circ Res** 90, 981-987.
- 140.** Zhou Z y Misler S. (1995). "Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells". **J Biol Chem** 270, 3498-3505.

